

BRUNO LOBÃO SOARES

**EFEITO DOS GLICOSAMINOGLICANOS (GAGs) SOBRE A PROGRESSÃO DO
GLIOMA C6 -ABORDAGENS *IN VITRO* E *IN VIVO*.**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade federal de Santa Catarina, como
requisito parcial para a obtenção do título
Mestre em Neurociências**

Orientadora: Prof^a Dra. Andréa Gonçalves Trentin

Co-orientador: Prof. Dr.; Márcio Alvarez da Silva

Florianópolis- SC

2001

**"GLICOSAMINOGLICANOS E PROGRESSÃO TUMORAL DO GLIOMA C6,
ABORDAGENS *IN VITRO* E *IN VIVO*".**

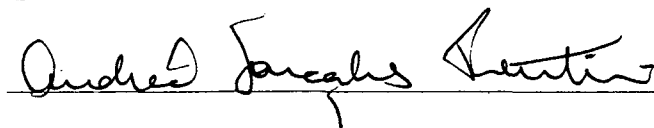
BRUNO LOBÃO SOARES

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

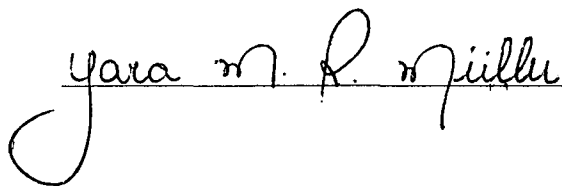
na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final
pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientadora



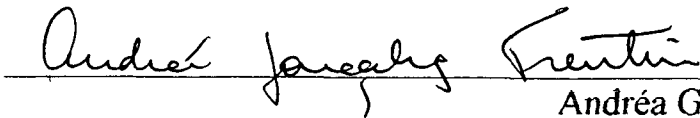
Andréa Gonçalves Trentin

Coordenadora do Curso

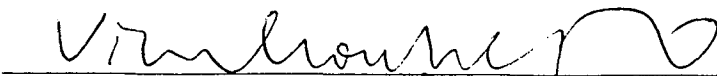


Yara Maria Rauh Müller

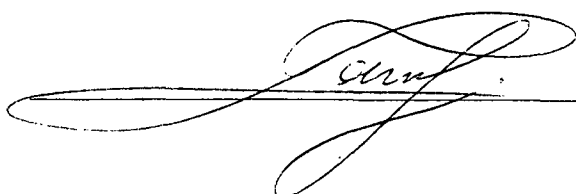
Banca Examinadora



Andréa Gonçalves Trentin (Presidente)



Vivaldo Moura Neto



Carlos Zanetti

*“ A experiência não é apenas aquilo
que vivemos , mas aquilo que se fez
daquilo que vivemos ”*

Aldous Huxley

À todos aquelas, pai, mestres e amigos, que
conheci nesta breve jornada sobre a Terra e
que se foram, os quais ainda gostaria de ao
menos trocar um aperto de mão.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Andréa Trentin, verdadeiro exemplo de pesquisadora e professora, pela receptividade em seu laboratório, por ter me dado a oportunidade de vivenciar estes dois anos de aprendizado na cidade de Florianópolis, pela compreensão (e paciência) tida muitas e muitas vezes, e principalmente, por ter me ensinado coisas que serviram em muito para o meu engrandecimento como pessoa e profissional.

Ao prof. Márcio Alvarez, seu esposo, que também reúne qualidades que acho notáveis, como, principalmente, o que classifico como maneira moderna de conduzir uma pesquisa, tendo a sabedoria de dar ênfase ao necessário, e colocando os pensamentos de uma maneira simples ao alcance de todos, e ainda, estando sempre aberto a novas sugestões e idéias.

Aos professores da Neurociências, por terem nestes anos nos dado uma fração de seu grande conhecimento e experiência de uma maneira dedicada, clara e, principalmente, motivada, como também por terem muitas vezes em meu trabalho estado dispostos a me ajudar, tirar dúvidas e dar conselhos úteis, como por exemplo a prof.a. Marta Paschoalini, o prof. Moacir e o prof. Odival.

Ao prof. Mauro Nicolau, por ter permitido gentilmente que fosse desenvolvido parte do trabalho em seu laboratório (estereotaxias) e por ter dado a chance de desenvolver um projeto também com o glioma como objeto de estudo.

À prof.a. Iara Muller e o prof. Paulo (Paulinho), por terem fornecido o apoio logístico, pessoal e material de seu laboratório, como o fluxo laminar e o suporte para a realização das fotos de histopatologia, assim como ao pessoal deste laboratório, especialmente a Cristiane Pacheco, Marcelo Dias e o Dib Ammar, por sua boa vontade coleguismo em cooperar com o que fosse preciso.

Ao Ronie, por seu companheirismo, tanto no ambiente de trabalho como no lazer, que soube proporcionar com seu estilo descontraído e ao mesmo tempo de bastante empenho, muitos momentos de prazer e aprendizado.

Ao Dr. Roger Walz, talvez o maior exemplo de dinamismo e versatilidade que conheço, por seu entusiasmo contagiante, seu estímulo e idéias enriquecedoras.

À prof.a. Thereza, que gentilmente também permitiu que algumas estereotaxias fossem realizadas em seu laboratório, dentre outras gentilezas as quais sempre se mostrou disposta a demonstrar.

Ao amigo Marco Stimamiglio, companheiro de laboratório, por ter ajudado a tornar agradável o ambiente de trabalho, como também por ter por vezes ‘tomado conta das células’, além de ter me contribuído para o aperfeiçoamento de minhas qualidades técnicas.

Ao Ricardo, bioquímico nato e exímio dançarino de chula, pelos momentos de descontração no trabalho, pelas observações sempre pertinentes e inteligentes, ao melhor estilo caçadoreense.

Ao prof. e amigo Giordano Wosgrau, que cuidou gentilmente dos animais quando não podia fazê-lo, e por ter também com sua cultura, propriedade e macarronada, ter contribuído para que, no melhor sentido da palavra, tenha desenvolvido a minha ‘auto-organização’.

À amiga Claudia (cientificamente, a “Mendes de Aguiar” várias vezes citada neste trabalho), quem, muitas vezes demonstrando paciência para muito além de sua conhecidíssima personalidade, teve sem dúvida a maior participação física neste trabalho, tanto por seu estudo sobre o clorato in vitro como pelo cuidado que dividiu comigo na cultura. E ainda, por ter sempre respondido prontamente àquela pergunta repetitiva mas inevitável de todos os dias: “Cláudia, vai ter célula hoje?”

Ao também companheiro de mestrado Marcos Anjos, que, fazendo jus ao provérbio “nos menores frascos, os melhores perfumes”, revelou-se um excelente parceiro de trabalho, tanto com uma obstinação apreciável como com um bom senso de humor, que permitiu o trabalho fluir sem complicações e bastante aprazivelmente.

Ao colega de mestrado, o “capitão” Aloísio, que, sem sua ajuda imprescindível, não teria sido possível a confecção dos hemogramas.

À colega Cidônea, também pelos seus bons conselhos e observações sobre o trabalho e a vida.

Ao prof. Ricardo Tramonte da Histologia e à Dra. Mariuccia, da Macro e Micro, como também à Ilza do departamento de Histologia da UFRRJ, por suas colaborações indispensáveis para a feitura das histopatologias.

Aos demais colegas da turma de Neurociências, por seu companheirismo e maturidade que fizeram com que nosso aprendizado nas disciplinas tivesse um rendimento mais do que satisfatório.

Ao Nivaldo, que, além do seu bom humor, sempre procurou ajudar com presteza e uma camaradagem especial nesses dois anos de convivência.

Aos amigos e colegas da farmaco, Fábio (fiel companheiro de Rural), Ramsés II (Juliano), Eunice, Márcia e Alessandra, e especialmente à Raquel Maria, pelo companheirismo, por terem me proporcionado bons momentos de descontração, assim como pelos conselhos e observações úteis ao meu trabalho.

Aos professores da Rural que sempre me deram apoio e entusiasmo científico e sem os quais talvez não tivesse encontrado força moral para realizar esse empreendimento, o Luís Carlos Reis (Silvio Santos), Alcides Marinho (Sidharta), Fred e o Chico (Elson) , exemplos de conciliação de humanidade e cientificismo.

Aos professores do Zaccaria, em especial ao Frederico (quem praticamente me iniciou nos conhecimentos da biologia e grande amigo e mestre), ao Regina (*in memoriam*), sem dúvida o melhor professor de português que já existiu e meu grande iniciador nas humanidades.

Ao amigos Luizão (com seus reais dotes culinários) e Free Amazônico (Pedro Linke), ele e seu inseparável Freemóvel, companheiros formidáveis e de um caráter imaculado, que me acolheram na Pig's e me fizeram sentir praticamente parte de sua família em Florianópolis.

Ao amigo Mineiro (Marco Antônio de Lorenzo), verdadeiro bandeirante, que abriu-me a rota de circunavegação a Florianópolis, além de ter contribuído enormemente nestes dois anos no meu crescimento artístico (especialmente musical), científico e como pessoa, além de seus conselhos sempre úteis e por seu arrojo e determinação.

Ao pessoal do Cangaia (Seizo, Carlão, Lampião e Guilherme), como ao pessoal do Coral, por terem me dado a chance de participar de um movimento musical e de companheirismo engrandecedor.

Ao mestre Dennis Werner, objeto de profunda admiração, por ter me introduzido nos conhecimentos da Antropologia, como também pelos momentos bastante agradáveis em sua companhia.

Por fim, à minha família (em especial a minha mãe, Maria do Carmo, irmã , e as minhas tias Lourdes e Icléa) que me deu inteiro apoio para que me lançasse a essa empreitada do mestrado, e souberam compreender a importância disto para meu engrandecimento técnico e pessoal.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu pai (*in memoriam*) , um exemplo de dedicação aos filhos e à família, e acima de tudo um mestre, falecido uma semana antes de eu ter vindo iniciar em Florianópolis as atividades de Mestrado, e quem, com certeza, creio que estaria orgulhoso se estivesse aqui.

LISTA DE ABREVIACÕES

AE-Arena de Exploração

BEG- (Departamento de) Biologia Celular, Embriologia e Genética

C6-Células da linhagem C6

CCB- Centro de Ciências Biológicas

CD4+- Células(linfócitos T) do tipo CD4+(tem a proteína na membrana), ou T helper

CD8+- Células(linfócitos T) do tipo CD8+(tem a proteína na membrana), ou T citotóxica.

Clor. ou Clorato – Clorato de Sódio

Col IV ou Col – Colágeno tipo IV

Cond- Condroitin-sulfato

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, ou Meio de Dulbecco modificado

Fn-Fibronectina

Gag(s) – Glicosaminoglicano(s)

HE-Hematoxilina e Eosina

Hep-Heparina

IC- Intracerebral

Inoc.-Inoculado

Lam-Laminina

LT- Linfócito T

MEC- Matriz Extracelular

PBS- Phosphate Buffer Saline (Tampão salina-fosfato)

Pg(s) – Proteoglicano(s)

SC- Subcutâneo(a)

Sensib.- Sensibilizados (com injeção intraperitoneal)

SID- Uma vez ao dia

SNC- Sistema Nervoso Central

Trat.-Tratado(s)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	xiii
ABSTRACT	xvi
RESUMO	xviii
1.0. INTRODUÇÃO	1
-Câncer	1
-Gliomas	4
-Aspectos Patológicos e Imunológicos de Gliomas	6
-O Glioma de Rato C6	10
-A Matriz Extracelular e sua Interação co Células Tumorais	11
-O Modelo do Clorato de Sódio	16
-Trabalhos Anteriores do Laboratório	17
2.0.OBJETIVOS	19
3.0. MATERIAIS E MÉTODOS	22
-Animais	23
-Cultura de Células	23
-Ensaio de Adesão Celular	24
-Implantação Subcutânea do Glioma C6	25
-Implantação <i>in vivo</i> Intracerebral de Células C6 (IC) na estereotaxia	25
-Fixação de cânulas intracerebrais, inoculação do glioma C6 e posterior tratamento via cânula	26
-Experimentos de Sobrevivência	27
-Análises Histopatológicas	27
-Hemogramas	28
-Arena de Exploração	28

-Grupos Experimentais	30
-Análise Estatística	32
4.0. RESULTADOS	35
-Experimentos de Adesão	36
-Inoculações Subcutâneas	47
-Experimentos de Sobrevivência	51
- Análises Histopatológicas	56
-Hemogramas	62
-Análise Comportamental e Sintomatológica (teste da arena de exploração)	65
5.0. DISCUSSÃO	73
6.0. CONCLUSÕES	90
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
8.0. TABELA ANEXA	108

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1- Inoculação de PBS através da cânula	33
Figura 2- Aparelho de padronização de Cortes Coronais de Encéfalos	34

RESULTADOS

Figura 1- Curva de concentração das proteínas de matriz extracelular sobre a adesão de células C6.	37
Figura 2: Efeito da Combinação das Proteínas da MEC na Adesão de C6	38
Figura 3- Efeito de Diferentes Concentrações de Heparina na Adesão de C6 em Proteínas da MEC Isoladas ou Agrupadas.	40
Figura 4- Efeito de Diferentes Concentrações de Condroitin na Adesão de C6 em Proteínas da MEC Isoladas ou Agrupadas.	41
Figura 5- Efeito de Diferentes Concentrações de Heparina Pré- Incubada com as Proteínas da Mec na Adesão de C6 nessas proteínas Isoladas ou Agrupadas	43
Figura 6- Efeito da Heparina Pré-Incubada com a Célula sobre a Adesão de C6 sobre Proteínas da MEC.	48
Figura 7- Diâmetro da Massas Tumerais Injetadas Subcutâneas nos Grupos não tratado e tratado com Clorato Após Trinta Dias de Inoculação.	
Figura 8: Aspecto da Massas tumorais subcutâneas retiradas dos animais inoculados SC aos 30 dias.	49
Figura 9: Aspecto dos Animais inoculados com tumor subcutâneo aos 30 dias.	50
Tabela1- Inoculação Intracerebral do Glioma C6	52
Figura 10- Curvas de Sobrevivência dos Animais Inoculados Intracerebralmente	

com Glioma C6 e submetidos a Diversos Tratamentos com Clorato.	54
Figura 11- Tumores cerebrais à Macroscopia	55
Figura 12- Análise Histopatológica de Efeitos de diferentes tratamentos com Clorato de Sódio no glioma C6 na área ocupada pelo tumor no parênquima cerebral aos Dez dias de Inoculação.	59
Figura 13– Cortes coronais de encéfalos de animais tratados e controle inoculados intracerebralmente com o glioma C6 ao aumento de 100X.	60
Figura 14- Aspecto histopatológico da área tumoral encontrada no parênquima cerebral de animal inoculado com células C6 sem pré-tratamento, corado em HE.	61
Figura 15- Aspecto de cortes coronais de encéfalos de animais na lupa de 7X	62
Figura 16- Parâmetros Sanguíneos da série branca em animais sensibilizados com células C6	64
Tabela 2- Aspectos da Série Vermelha de Grupos com Diversos Tratamentos de Inoculação e Sensibilização com células C6.	65
Figura 17- Frequências Comportamentais na Arena de Exploração em Animais Inoculados em via Intracerebral com C6	68
Figura 18: Frequências Comportamentais na Arena de Exploração em Animais Inoculados com células C6 pré-tratadas com clorato de sódio por 48 horas.	69
Figura 19: Frequências Comportamentais na Arena de Exploração em Animais Inoculados com células C6 pré-tratadas com clorato de sódio por 48 horas.	
Tabela 3- Sintomatologia Clínica	70

TABELA ANEXA

Tabela : Valores Hematológicos Normais de Ratos	108
--	-----

ABSTRACT

The aim of this work was to verify glycosaminoglycans' (GAGs) effects on C6 glioma cells adhesion, *in vitro*. We were also interested in analyze the effects of GAGs sulfation in intracerebrally implantation of the glioma. Cell adhesion is a critical step for the tumor implantation. Adhesion assays were made to test the properties of ECM proteins (Laminin, Fibronectin and Collagen IV) and GAG's (Heparin and Chondroitin-sulfate) in the C6 adhesion to ELISA plates. The ECM proteins enhanced C6 adhesion in a dose dependent manner. Heparin presented different interactions with each protein, inhibiting cell adhesion to Laminin, enhancing to Collagen IV and not altering to fibronectin. On the other hand, the presence of chondroitin-sulfate inhibited the C6 cell adhesion to the three ECM proteins. The pre-incubation of heparin with the ECM proteins or with the C6 cells, may suggest that interactions among ECM proteins and GAG's might be specific to determine the cell adhesion.

Previous works of our laboratory showed that the *in vitro* treatment of C6 cells with Sodium Chlorate (an inhibitor of GAG's sulfation) reduces the cell adhesion and proliferation in a dose-dependent manner without cellular death. We, then, tested if Sodium Chlorate would also affect the *in vivo* growth of C6 glioma, the imunological aspects of that treatment. We performed subcutaneous (2×10^7 cells) and intracerebrally (1×10^5 cells) inoculations, and analyzed the hemograms, animal survival and behavior and histopatological tests. In the subcutaneous local treatment, sodium chlorate proved to be efficient in reducing the tumor growth 30 days after C6 inoculation when compared to control. In Intracerebrally inoculations, the C6 pre-treatment (48 h) with sodium chlorate and the posterior treatment at the tumor site significantly reduced the glioma growth when compared to controls, showed by the survival and histopathological analysis.

Intraperitoneal sensitization with C6 cells pre-treated with sodium chlorate or with control cells, impaired the glioma growth after intracerebrally inoculations, as showed by survival and histopathological tests.

The hemogram analysis showed a blood lymphocyte reduction 24 and 28 days after intracerebrally inoculation of C6 glioma cells although there were no differences in the white cell line of sensitized and control groups.

The behavioral tests showed reduction in exploratory parameters in the C6 inoculated groups when compared to C6 pre-treated inoculated group or to control-sham group. This data may suggest that GAGs' sulfation could be important to the initial establishment and progression of the C6 glioma *in vivo*.

RESUMO

O presente estudo tem por objetivo verificar efeitos dos glicosaminoglicanos sobre a adesão *in vitro* do glioma C6. Analisamos também, os efeitos da subsulfatação dos GAGs na implantação intracerebral do glioma. Sendo a adesão um passo crítico para o estabelecimento inicial tumoral, realizamos ensaios de adesão celular para testar propriedades de proteínas da Matriz Extracelular (MEC) (laminina, fibronectina e colágeno tipo IV), assim como de GAGs (heparina e condroitin-sulfato) na adesão das célula C6 em placas de ELISA. As proteínas da MEC estimularam a adesão de C6 de modo crescente. A heparina apresentou diferentes efeitos de interação com cada proteína da MEC testada, inibindo a adesão a laminina, aumentando a colágeno IV e não alterando a Fibronectina. Por outro lado, a presença de condroitin-sulfato reduziu a adesão de C6 de modo dose-dependente, às três proteínas testadas. Os experimentos de pré-incubação da heparina às proteínas da MEC ou às células, podem sugerir que interações entre a MEC e GAGs podem ser específicas para determinar a adesão celular.

Trabalhos anteriores do nosso laboratório mostraram que o tratamento *in vitro* de células C6 com clorato de sódio (inibidor de sulfatação de GAGs) reduz a adesão e a proliferação de um modo dose-dependente sem induzir morte celular. Assim, nós testamos os efeitos do tratamento *in vivo* com o clorato de sódio sobre o crescimento do glioma C6, e procuramos verificar alguns aspectos imunológicos. Realizamos inoculações subcutâneas (2×10^7 células) e intracerebrais (1×10^5 células) de células C6 e analisamos os hemogramas, testes anatomopatológicos, histopatológicos, de sobrevivência e de comportamento. No tratamento local subcutâneo, clorato de sódio revelou ser eficiente em reduzir o crescimento tumoral 30 dias após a inoculação de células C6. Nas inoculações intracerebrais, o pré-tratamento de células C6 com clorato de sódio e tratamento posterior no sítio tumoral, reduziu o crescimento do glioma, revelado pelos testes de sobrevivência e histopatologia.

Sensibilizações prévias, intraperitoneais, com células C6 pré-tratadas com clorato de sódio ou com células controle, inibiram o crescimento do glioma após a inoculação intracerebral de células C6, como mostrado nos experimentos de sobrevivência e nas histopatologias.

Os hemogramas revelaram uma redução linfocitária 24 e 28 dias após a inoculação intracerebral de C6, porém sem diferenças na leuco e linfometria entre os grupos sensibilizados,

entre si e em relação ao controle. Os testes comportamentais revelaram redução em parâmetros exploratórios nos animais inoculados intracerebralmente com C6 quando comparados com o grupo que recebeu C6 pré-tratado com clorato de sódio ou com o grupo controle-operado(*sham*).

Estes resultados sugerem que a sulfatação dos GAGs pode ser importante para o estabelecimento e progressão do glioma C6 *in vivo*.

INTRODUÇÃO

1.0. INTRODUÇÃO

1.1.Câncer

A patologia conhecida como câncer constitui uma das maiores preocupações em saúde pública, por sua elevada mortalidade e morbidade inerente. Afeta indistintamente a todas as camadas sociais, e constitui, talvez, a mais relevante das chamadas “doenças da modernidade”. Por conta das novas técnicas implantadas no sistema de saúde mundial e das novas descobertas no campo da produção e industrialização de alimentos, houve um aumento considerável na expectativa de vida, nos últimos cinquenta anos. O câncer representa, em parte, uma consequência destas modificações, uma vez que estamos passando cada vez mais tempo na chamada terceira idade e estamos consumindo cada vez mais produtos (alimentos ou substâncias como tabaco) e energias como eletromagnetismo ou raios-X, que não faziam parte da vida cotidiana em um passado relativamente recente. Esta mudança nos hábitos, seja para se adequar a uma vida muito mais competitiva e estressante da sociedade contemporânea, seja para promover o contato do organismo com compostos potencialmente mutagênicos, pode implicar numa maior susceptibilidade do homem a esta enfermidade. Em vista disso, a ciência tem feito grande esforço para sua prevenção e tratamento, nos aspectos farmacológico, molecular, patológico, terapêutico e de interesse público. A incidência dos tumores malignos (como são conhecidos os cânceres) tem aumentado muito nos últimos cinquenta anos, sendo a enfermidade que representa a maior estatística de *causa mortis* depois dos acidentes cardiovasculares (dados do Ministério da Saúde, 1997).

Tumores malignos, na verdade, correspondem a um conjunto de patologias com características peculiares: proliferação descontrolada, capacidade de penetrar na corrente sanguínea ou vasos linfáticos e invadir tecidos normais formando as chamadas metástases. Outra característica é a secreção de substâncias como citocinas, hormônios e enzimas, os quais influem seriamente na regulação da homeostase geral do organismo e no controle da sensibilidade imune (Ruddon, 1995; Alberts *et al*, 1997), tendo como consequência final, a morte do paciente. Mutações genéticas podem ser a causa da maioria dos tumores (Alberts *et al.*, 1997). Desse modo, uma célula anormal pode dividir-se e dar origem ao tumor. Contudo, uma única mutação não é suficiente para desenvolver um câncer. Dependendo da frequência de divisão das células, o câncer, em geral,

ocorre por um acúmulo de alterações genéticas, que gradativamente degeneram as células. A regulação da proliferação celular é feita por genes, cujos produtos podem estimular ou inibir o aumento no número de células. Nas últimas décadas, foram identificadas numerosas alterações genéticas que afetam genes de controle do crescimento celular (Lengauer *et al.*, 1998). Um primeiro tipo de mutação torna hiperativo um gene estimulante da proliferação celular. Essa é uma mutação dominante, onde apenas um dos alelos precisa estar mutado. O gene alterado é chamado oncogene, o alelo não alterado é chamado proto-oncogene. A ativação de um oncogene estimula e descontrola o crescimento de células suscetíveis. Um segundo tipo de mutação, torna inativo um gene chamado gene supressor do tumor. Os produtos dos genes supressores do tumor inibem a proliferação celular (Alberts *et al.* 1997). Esta é uma mutação recessiva, na qual os dois alelos devem sofrer alterações ou até mesmo serem deletados. O p53, por exemplo, é um gene supressor de tumor que pode bloquear o ciclo de divisão celular na fase G1 ou induzindo a apoptose celular. A perda dessa função, produzida por uma mutação, é presente em mais de 30% dos astrocitomas estudados. Outro gene supressor de tumor é o MMAC1, do cromossomo 10. Esse gene tem sido encontrado mutado em gliomas malignos (Fueyo *et al.* 1999). Além disso, sabe-se que a sequência de DNA das células tumorais é bastante instável, podendo ocorrer duplicações, perdas ou translocações de cromossomos em grau maior do que em células normais (Alberts *et al.*, 1997). Assim, duas grandes classes de genes críticos para o desenvolvimento de todos os tipos de câncer, incluindo tumores cerebrais, são agora reconhecidos: os genes supressores tumorais, os quais codificam genes que funcionam na inibição de proliferação celular e desenvolvimento de tumor, e oncogenes, que codificam proteínas que estimulam proliferação celular e mediam atividades biológicas importantes para invasão, neoangiogenese, escape imune e outras características de malignidade. Sendo que o mecanismo de amplificação de função, como no caso do gene que codifica o receptor de EGF, representa um mecanismo freqüente na formação de astrocitomas (Hill *et al.*, 1998), nosso objeto de estudo. Assim, o conhecimento mais apurado destes genes reguladores específicos (como também das proteínas por eles reguladas) poderia sugerir oportunidades para desenvolvimento de terapias mais efetivas e menos tóxicas (Hill *et al.*, 1998).

1.2. Gliomas

Gliomas são tumores neuroectodermais e correspondem aos tumores cerebrais mais freqüentes em seres humanos (29% de todos os tumores cerebrais primários), sendo, na maioria das vezes fatais. Os tumores cerebrais e de medula espinhal correspondem ao segundo tipo de câncer infantil mais freqüente (Hill *et al*, 1998). Os gliomas podem ser originários de três tipos celulares: astrócitos, oligodendrócitos e células endimárias e cada tipo apresenta características diferentes, como incidência, localização, idade preferencial e outros (Kleihues *et al.*, 1995). Em ordem de malignidade crescente, tumores astrocitários são classificados como astrocitoma, astrocitoma anaplástico ou glioblastoma multiforme. Astrocitomas pilocíticos são geralmente menos modificadores da condição histológica e são freqüentemente curados por cirurgia (Hill *et al*, 1998). O estudo dos gliomas permitiu observar os estágios (fenotípicos morfológicos, devido a sucessivas mutações genotípicas) entre a célula normal e a célula tumoral. No entanto, o que ocorre na prática médica, é que, por serem tumores de crescimento lento, o diagnóstico é feito tardiamente, quando o tumor em geral já se encontra em fase muito avançada e com alto grau de proliferação (Hervé Chneiweiss, 1994).

Os gliomas são caracterizados pela habilidade de serem altamente invasivos (Schiffer *et al*, 1997). A pesquisa de estratégias de controle dessas doenças tem levado a muitas vantagens em técnicas de diagnóstico e modalidades terapêuticas. Apesar disso, pacientes com tumores cerebrais malignos apresentam sobrevida média menor do que três anos. Os tumores primários cerebrais, especialmente os gliomas, são extremamente difíceis de serem controlados clinicamente devido ao seu comportamento altamente invasivo, sendo que isso implica na recorrência da patologia (Saris, 1996). Além disso, poucos quimioterápicos usuais, por sua lipossolubilidade, conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE), uma proteção neuro-vascular contra moléculas (proteínas, íons e muitos peptídeos) ou células potencialmente agressoras ao tecido. E ainda: os que o fazem (como a carmustina e a lomustina, do grupo das nitrosometiluréias) tem como inconveniente, graves efeitos colaterais (mielossupressão e falência renal), restringindo em muito o seu valor terapêutico (Goodman & Gilman, 1996). Nos últimos anos tem-se atentado especialmente para o estudo da BHE, visando a modificação farmacológica de algumas de suas propriedades e assim facilitando o aporte de quimioterápicos no sítio do tumor instalado (Takanori Inamura, 1994; Bartus RT,

1995). A BHE é formada por uma interação complexa entre células endoteliais de microvasos e uma membrana basal subjacente com células associadas, como as de músculo liso e pericitos e também os astrócitos, formando seus pés vasculares. Esta combinação de vários tipos celulares especializados confere à barreira hemato-encefálica uma capacidade seletiva de permeabilidade a células e a substâncias, podendo se tornar permeável, por exemplo se determinados receptores de sua superfície forem ativados (Zsuzsanna Fabry *et al*, 1994). Apesar disso, foi descoberto recentemente, que o tecido que constitui esta barreira na região do tumor apresenta propriedades diferentes da barreira hemato-encefálica normal, daí fala-se em Barreira Hemato-Tumoral (BHT). A BHT pode, pois, apresentar sensibilidade diferente da BHE para certos agentes modificadores de permeabilidade, como é o caso da injeção de agonistas de receptor B2 de Bradicinina como o RMP-7 (Cereport), que aumenta a permeabilidade a agentes na localização do tumor com muito maior amplitude do que no parênquima cerebral sadio (Bartus *et al*, 1995). Desse modo, a droga anti-tumoral pode atravessar com maior facilidade a barreira no local do tumor, sem maior comprometimento do parênquima sadio (Inamura *et al*, 1994).

A sobrevivência das células cerebrais tumorais depende de sua habilidade de aderir à matriz extracelular, proliferar, migrar e invadir o tecido adjacente, sem destruição efetiva por qualquer reação imunológica. Numerosos testes clínicos documentaram o padrão difuso e extensivo de infiltração dos gliomas malignos no parênquima cerebral, ao longo de tratos da substância branca e membranas basais vascular e meningeal. As células migratórias destes tumores não podem ser removidas cirurgicamente sendo responsáveis pela recorrência do tumor após a excisão cirúrgica radical. A composição da matriz extracelular pode ser um fator crítico em determinar o potencial invasivo das células cancerosas, desse modo a produção de elementos da matriz extracelular pelas células do glioma pode mediar sua invasão no tecido normal (Zhang *et al*, 1998). O glioma, depois de instalado, secreta fatores que irão atuar em um segundo passo em seu desenvolvimento, i.e., na tomada do parênquima sadio. Um processo bem conhecido e essencial é a indução de neoformação vascular para alimentar a expansão da área tumoral nas imediações do tumor, a chamada angiogênese tumoral. Esta angiogênese é por sua vez estimulada por citocinas que interagem com receptores do organismo hospedeiro, desencadeando uma proliferação exacerbada de células endoteliais e com o tempo retirando parte do aporte sanguíneo do organismo que passa a ser deliberado

para o tumor. Neste sentido, é conhecida a capacidade angiogênica da citocina *vascular endothelial growth factor* (VEGF), secretada por gliomas, atuando seletivamente em células endoteliais. Uma evidência crescente sugere que VEGF é um regulador chave em processos angiogênicos tanto de desenvolvimento quanto patológicos (Plate & Mennel, 1994). Gliomas avançados parecem ter, também, uma superexpressão de receptores de *epidermal growth factor* (EGF), o que provavelmente aumentaria sua taxa de proliferação, e podendo estar associado às progressivas mutações com perdas de genes em alguns cromossomos (James *et al*, 1988).

1.3. Aspectos Patológicos e Imunológicos nos Gliomas

Gliomas são tumores com algumas características únicas. Desse modo, seu crescimento muitas vezes é imprevisível, com súbitas acelerações de crescimento, o que torna o prognóstico difícil. Os gliomas possuem tendência a infiltrar o tecido normal adjacente, por vezes de um modo bizarro e irregular; isto torna a excisão cirúrgica plena de todas as células tumorais virtualmente impossível. No entanto, os gliomas raramente se expandem para fora do SNC, não possuindo característica migratória em outros tecidos. De todo modo, esses tumores mostram peculiares hiperplasia e proliferação de paredes vasculares, tanto em células endoteliais como de pericitos (Valter *et al*, 1997). As células de gliomas parecem não ter tendência ao intravasamento ativo para os capilares e vasos circunjacentes. Ao contrário, utilizam a parede externa dos vasos para guiarem sua migração intraparenquimal. É possível que ocorra, porém, devido ao crescente aumento da massa tumoral e conseqüente aumento da pressão intracraniana, rompimento de alguns vasos e componentes da barreira, possibilitando uma passagem passiva de células tumorais tanto para o espaço sub-aracnóideo como para o resto do organismo via circulação sistêmica (Bernstein *et al*, 1993).

Das subclassificações de gliomas, os glioblastomas são os mais complexos e danosos. O glioblastoma é uma neoformação metastática e difusa embora confinada ao SNC (Bernstein *et al*, 1993). Seria então considerado um tumor metastático intraparenquimal (Bernstein *et al*, 1993). A natureza metastática do glioblastoma no cérebro humano é demonstrada pelo aparecimento de tumores multifocais em cerca de 10%

dos casos. Apesar disso, os caminhos de migração dos tumores multifocais dentro do cérebro são bem conhecidos e foram descritos há sessenta anos atrás por Scherer (Scherer *et al*, 1940). Quando células do glioblastoma humano deixam o SNC, as mesmas podem crescer em outros tecidos e partes do corpo. Neste sentido, uma pressão intracranial elevada sempre esteve implicada na disseminação do glioblastoma para o peritônio, fígado, pulmão e ossos dos pacientes acometidos. Nesses pacientes, as células do tumor intracraniano são passivamente carregadas através da corrente pelo líquido cefalorraquidiano e/ou migram juntamente com a mesma caindo na circulação sistêmica. O glioblastoma sobrevive e cresce na sua nova localização (Bernstein *et al*, 1995).

Em gliomas experimentais como o glioma C6 de rato, foi observado que existe um padrão relativamente ordenado de proliferação vascular, sendo que os vasos neoformados induzidos pelo sistema tumoral, parecem estar localizados com muito maior evidência na parte periférica em contato com o parênquima cerebral. Esta neoformação vascular parece tomar parte somente a partir de um certo estágio de implantação do tumor (por volta das 3 semanas), não havendo anteriormente uma angiogenese passível de observação. Esta mudança nos níveis de indução angiogênica é concomitante com o aparecimento do padrão necrotico observado (Peoc'h *et al*, 1999).

No SNC, existem particularidades com relação aos tipos celulares de competência imune, que são diferentes dos outros sistemas. As células da micróglia (que são células macrofágicas) realizam a apresentação de antígenos a linfócitos no SNC. E recentemente tem sido descrito a atividade apresentadora de antígenos bastante relevante por parte dos astrócitos (tipo celular de maior tamanho com funções variadas), sendo que esta apresentação parece ser dependente na maioria dos casos da citocina e estimula linfócitos de subtipos variados em estudos feitos *in vitro* (Cornet *et al*, 2000). As células da micróglia parecem não ter um papel muito evidenciado no envolvimento imunológico com relação aos gliomas. Segundo Flugel e colaboradores, a micróglia se revela pouco capaz ou incapaz de apresentar antígenos de células tumorais de glioma a células T citotóxicas. Esta deficiência pode significar um papel importante no crescimento de gliomas *in vivo* (Flugel *et al*, 2000).

Com o crescimento do glioma no cérebro, há também uma alteração progressiva não só de sinalizações de células de competência imune, como de todo o sistema de citocinas e de

neuropeptídeos. A formação de tumores cerebrais já foi associada a níveis aumentados de IL-1 β , do receptor de IL1 tipo I, do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e do mRNA de TGF- β 1 em cerebelo, hipocampo e hipotálamo (Dix *et al*, 1999). As modificações desses sistemas concorrem com sintomas neurológicos e neuropsiquiátricos, perfazendo um eixo de estudo molecular e comportamental para as interações tumor-hospedeiro in vivo (Ilyin *et al*, 1999). No processo de apresentação de antígenos e da convocação de células imunocompetentes, os linfonodos cervicais desempenham papel central, agindo como linfonodos regionais, preparando as células T helper e citotóxicas para que estas últimas migrem para o SNC. Esta migração ocorre após duas semanas de desenvolvimento patologia tumoral a partir da inoculação das células nas bordas infiltradas de crescimento do tecido tumoral. O baço mais tarde parece também contribuir com o aporte linfocitário conforme avança o comprometimento sistêmico pela doença (Okamoto *et al*, 1999).

Estudos histológicos de gliomas humanos, constataram que o padrão infiltrativo de subtipos de linfócitos se mostrava largamente diferenciado, restrito ao subtipo linfocitário CD8+ ou linfócito T citotóxico. O subtipo CD4+ ou linfócito T helper, quase não foi evidenciado nesta análise, uma vez que ele é responsável pelo recrutamento de outros tipos celulares de competência imune e inclusive pelo direcionamento da produção de anticorpos feita pelos linfócitos B. Esta diferença de ativação dos dois subtipos celulares poderia ser uma das razões pela qual o organismo usualmente não consegue evocar resposta de abrangência suficiente para conter o avanço da patologia. A não ativação do subtipo T helper poderia ser consequência, entre outros fatores, do padrão de secreção de citocinas específico dos gliomas (Perrin *et al*, 1999).

Outros estudos contribuíram para dar ênfase à função dos linfócitos na contenção tumoral. Plautz e colaboradores (1998) obteve melhora no estado clínico de seus pacientes quando decidiu fazer uma estimulação autóloga (intradérmica) com as próprias células tumorais dos gliomas, sendo que estas foram injetadas juntamente com algumas células – tronco para proporcionar maior amplitude de resposta. Desse modo, obteve aumento tanto de células CD4+ como CD8+ nos linfonodos locais desses pacientes, o que podemos relacionar com o aumento médio da sua sobrevida. (Plautz *et al*, 1998). Estudos realizados em cultura de células evidenciaram inibição de secreção de citocinas por linfócitos em co-culturas de células de astrocitomas e linfócitos não-estimulados (Kowalski *et al*, 1999).

A alteração imunológica induzida pelo glioma não é apenas local, havendo comprometimento sistêmico de todo o organismo do paciente com o progresso da patologia, apresentando diminuição de capacidade de imunidade celular (Brooks *et al*, 1972.; Young et Kaplan, 1976 ; Mahaley *et al*, 1977, Elliot *et al*, 1984). Foram evidenciados anergia a antígenos bacterianos, linfopenia e diminuição de respostas de hipersensibilidade (Brooks *et al*, 1977). Estudos *in vitro* revelaram que linfócitos periféricos de pacientes com gliomas, exibiram variados níveis de anergia responsiva a mitógenos de células T como concavalina A(conA) e fitohemaglutinina (PHA), ou anticorpo monoclonal anti-CD3, assim como para o mitógeno dependente de célula T(MDT) (Elliot *et al*, 1984, Elliot *et al*, 1987). Além do mais, células T obtidas de pacientes com gliomas não promovem resposta ativadora “helper” em culturas alogênicas *in vitro* com mitógenos *pokeweed* (Rozman *et al*, 1985, Dix *et al*, 1999). De fato, ocorre uma imunossupressão nesses pacientes, e a linfocitopenia de células T parece desempenhar papel chave nesse processo (Dix *et al*, 1999). No entanto, a linfopenia T sozinha não é responsável pela diminuição da função imunológica. As células T passam a ter síntese diminuída de interleucina 2 (IL -2), assim como a não sensibilização do receptor (Ausiello *et al*, 1992). Há indícios, porém, de que a inabilidade de este tipo celular de entrar em fase de expansão clonal se deva à ativação de apoptose mediada pelo glioma (Rouvier *et al*, 1993). Fatores secretados pelo glioma influenciam deste modo a resposta imune de seus hospedeiros, levando-os à imunossupressão (Dix *et al*, 1999)

Interessantemente, a característica necrótica dos gliomas parece ser resultado de uma falta de vascularização em áreas de rápida expansão tumoral e não propriamente da ação de células T (Schneider *et al*, 1992). Células T de pacientes apresentam danos funcionais, como diminuição na fosforilação de receptores tirosina quinase (Veillete *et al*, 1989) e deficiência na mobilização intracelular de cálcio (Abraham *et al*, 1991, Dix *et al*, 1999). Além disso apresentam síntese e resposta a IL-2 comprometida, o que ocasiona grande redução nas estimulações autócrina e parácrina (Elliot *et al*, 1997).

Células linfocitárias do tipo Natural Killer (NK), as quais são citotóxicas para células tumorais, são também bastante afetadas nesta patologia, o que parece ser causado tanto por redução da capacidade de sensibilização quanto do número circulante. A ativação destas células parece depender de IL-2 e IFN- γ , citocinas com expressão deprimida por linfócitos no curso da doença (Elliot *et al*, 1987; Ausiello *et al*, 1991; Giovarelli *et al*, 1998).

Desse modo, podemos evidenciar um expressivo e direcionado comprometimento da função imune pela crescente massa do glioma, agindo tanto a nível local como sistêmico, essencial para a progressão da patologia. À medida em que a massa tumoral se desenvolve e utiliza mecanismos angiogênicos, é progressivamente identificada pelas células imunes, havendo, então, necessidade de mecanismo imunossupressor para que as células tumorais (que assumem identidade própria) continuem a sua progressão.

1.4. O Glioma de rato C6

O glioma C6 de rato, corresponde a uma linhagem celular glial pouco diferenciada, com características tanto de astrócitos quanto de oligodendrócitos (Ruddon *et al*, 1991; Trentin *et al*, 1997), tendo sido induzida pela droga N-nitrosometiluréia (Benda *et al*, 1968). O glioma C6 tem sido utilizado como modelo de estudo para tumores no SNC e para propriedades gliais (Trentin *et al*, 1997). Estudos recentes demonstraram que a linhagem C6 produz fatores neurotróficos para diversas regiões do Sistema Nervoso Central e Periférico (como o fator de crescimento de nervo - NGF), proteínas estruturais como laminina, fibronectina, colágenos do tipo I e IV, nexina I e heparan sulfato proteoglicano, capazes de estimular a adesão celular e o crescimento neurítico (Lander *et al*, 1983; Guenther *et al*, 1985; Coyle, 1995). O glioma C6 parece depender de várias citocinas para sua progressão, assim como de uma adequada proporcionalidade entre elas. É o exemplo da citocina insuline-like growth factor (IGF-I). Culturas de células C6 apresentaram altos níveis de transcritos de IGF-I, e o tratamento com o antisense para esta proteína, dramaticamente decresceu os níveis de IGF-I transcrito. Isto resultou no não crescimento dos tumores quando inoculados *in vivo* (Trojan *et al*, 1992).

O tratamento tanto *in vivo* como *in vitro* com o RNA antisense para o receptor de fator de crescimento epidermal (EGF) também foi capaz de inibir proliferação de C6, sugerindo efetividade dessa citocina no crescimento tumoral (Pu *et al*, 2000).

Segundo Smith e Ramirez (1999) O glioma C6 expressa também, proteínas precursoras de neurotransmissores, como a proteína liberadora de dopamina (DARP), tendo assim potencial de influenciar vários sistemas no organismo hospedeiro. (Smith *et al*, 1999). Além disso, NGF apresenta influência regulatória na síntese de proteínas, e padrão de diferenciação e crescimento

em C6 (Watanabe *et al*, 1999). Células C6 programadas por transfecção de DNA para expressar a proteína fibrilar ácida glial (GFAP) característica de astrócitos maduros, apresentam tumorigenicidade suprimida, sugerindo que GFAP também é um regulador crítico no seu crescimento (Toda *et al*, 1999).

1.5. A Matriz Extracelular e sua interação com as células tumorais

A matriz extracelular (MEC) é produzida pelas próprias células do tecido e corresponde a um complexo multifuncional de proteínas e proteoglicanos altamente organizados para providenciar a integridade estrutural do organismo (Venstrom and Reichardt, 1993). A MEC participa da regulação do comportamento das células contidas nessa matriz, podendo influenciar vários aspectos do seu funcionamento como adesão, migração, proliferação e morfologia (Alberts *et al.*, 1997). Os componentes da MEC constituem as chamadas membranas basais que dão suporte tecidual, servindo como substrato para a fixação e orientação das células, mantém a integridade tecidual, agem como barreiras filtradoras e sendo importantes para o desenvolvimento embrionário e reparo tecidual. A composição da MEC pode inclusive, influenciar a cascata de ativação bioquímica que leva a morte celular programada, a chamada apoptose celular, tendo particular importância neste processo, enzimas digestivas de proteínas ativadoras de genes promotores de apoptose, como as caspases (Yun-bo shi *et al*, 1999).

Consideráveis porções de membrana basal podem ser isoladas de tumores, sendo usualmente mais solúveis do que componentes de membranas basais dos tecidos normais (Timpl *et al*, 1987). Este fato demonstra diferenças estruturais na MEC de células normais e tumorais. A MEC é composta principalmente por proteínas e carboidratos. Podemos ressaltar como componentes mais expressivos, as proteínas colágeno, fibronectina e laminina e proteoglicanos que são moléculas mistas com um eixo protéico e ramificações de carboidratos (os glicosaminoglicanos). O Colágeno pode ser expresso sob variações estruturais pela célula, as quais desempenham funções específicas. Neste sentido, o Colágeno tipo IV é o maior componente de membranas basais, apresentando-se em uma tripla hélice de aproximadamente 400nm em comprimento formada por duas cadeias alfa1 e uma alfa2 (Trueb *et al*, 1982). As

interações entre as moléculas de colágeno formam uma rede tridimensional que serve como substrato ao qual os outros componentes da MEC são fixados (Khasigov *et al*, 1996).

A proteína laminina se apresenta em forma de cruz, formada pela interação entre as três cadeias: A (400 kDa), B1 (200 kDa) e B2 (200 kDa), possuindo um peso molecular de aproximadamente 900 kDa. A Laminina interage com os outros componentes estruturais das membranas basais, incluindo o colágeno do tipo IV, nidogênio, heparan sulfato proteoglicanos e fibronectina. As funções da laminina são principalmente determinadas por sua habilidade de ligação com a célula e modulando o seu comportamento. Conforme o tipo celular, a laminina pode modificar seu crescimento, viabilidade, morfologia, diferenciação ou motilidade (Beck, K., Hunter, I. e Engel, J. 1990). A molécula de laminina possui alguns sítios de ligação com a célula, as integrinas. O número de receptores para laminina varia entre 104 e 105 por célula (Khasigov *et al*, 1996).

A fibronectina é outra glicoproteína estrutural da MEC de importância relevante, sendo composta por duas subunidades unidas entre si por duas pontes dissulfeto, próximo às extremidades C-terminal. Apresenta domínios específicos para outras proteínas da MEC, para glicosaminoglicanos e para receptores de superfície celular (integrinas). Fibronectina exerce papel importante na adesão célula-matriz, podendo promover migração celular, em um ciclo de adesão - perda de adesão / adesão celular (Junqueira & Carneiro, 1991; Alberts *et al.*, 1997). Alguns tipos celulares apresentam MEC com alta concentração de fibronectina para orientação migratória durante o desenvolvimento (Boucaut *et al*, 1990) A migração celular ao longo da matriz de fibronectina está também envolvida na recuperação de injúrias (Clark and Colvin, 1995).

As integrinas correspondem aos receptores celulares das moléculas constituintes da matriz extracelular, formando uma grande família de proteínas transmembranares envolvidas em interações intercelulares e célula-matriz (Hynes, 1992). As integrinas que são responsáveis pela sinalização para o interior da célula segundo o modo tradicional dos receptores de superfície celular (Clark *et al.* 1995). Elas compreendem uma grande família de proteínas heterodiméricas que mediam interações célula-célula e célula matriz. São expressas na grande maioria dos tipos celulares e implicadas em vários processos biológicos como desenvolvimento embrionário, inflamação e invasão tumoral (Fukushima *et al*, 1998). Ocorre especificidade de interação entre cada integrina e seus ligantes. Esta especificidade é determinada pela estrutura

da integrina e do tipo celular. A afinidade pelo ligante pode ser controlada, também, por outras proteínas de membrana (Hemler *et al*, 1990). As integrinas participam tanto em processos fisiológicos como fisiopatológicos, como por exemplo na fibrilogênese de fibronectina que é um evento importante na recuperação pós-traumática e na transformação de células tumorais (Wu *et al*, 1995).

Os Proteoglicanos também apresentam importância relevante na composição e função da MEC. Os proteoglicanos interagem entre si, com a célula e com citocinas e fatores de crescimento, regulando importantes funções do metabolismo celular. São compostos onde a parte protéica é sintetizada no retículo endoplasmático e a parte composta por carboidratos é adicionada e sulfatada no complexo de Golgi, por enzimas transferases. Sendo, portanto, constituídos de um eixo protéico com várias ramificações de dímeros de açúcar, os chamados glicosaminoglicanos (GAGs) (Alberts *et al*, 1997). Os proteoglicanos ligam-se à porção C-terminal da cadeia longa da laminina e a duas regiões da tripla hélice de colágeno tipo IV (Laurie *et al*, 1986). Um tipo particular de Heparan Sulfato (HSPG), a molécula Agrina, tem função sinaptogênica no desenvolvimento do Sistema Nervoso, podendo ligar-se à laminina por sua porção amino-terminal (Denzer *et al*, 1997). Há evidência de que os HSPGs de membrana basal correspondam um grupo heterogêneo, coexistindo em algumas formas estruturais (Khasigov *et al*, 1996)

Segundo Sondermann e colaboradores (1998), em ensaios de migração e adesão celular de fibroblastos, laminina e fibronectina possuem diferentes especificidades funcionais, sendo que laminina parece influenciar mais os processos de migração em gel e fibronectina parece controlar com mais evidência os processos de adesão celular nas placas de ELISA. E ainda: os mecanismos de cascata intracelular ativado pelas duas moléculas parece envolver mediadores diferentes, a começar pelas integrinas de ligação (Sondermann *et al*, 1999).

Recentemente, tem sido demonstrado que as moléculas da MEC exercem um papel ativo no crescimento e diferenciação tumoral (Martin e Timpl, 1987). As principais proteínas da MEC têm sido encontradas em astrocitomas malignos, incluindo colágeno (tipos I, II, IV, V e VI), fibronectina e laminina (Bellon *et al*, 1985) e vitronectina (Gladson *et al*, 1991). Durante a progressão tumoral, ocorrem complexas interações entre as células malignas e componentes da MEC (Paulus *et al*, 1996; Haugland *et al*, 1997; Tamaki *et al*, 1997). Experimentos *in vitro*, de migração de gliomas sobre preparações de membrana basais ou componentes da matriz

extracelular, sugerem envolvimento funcional de citocinas, proteases e moléculas de adesão (Paulus *et al.*, 1996; Haugland *et al.*, 1997; Tamaki *et al.*, 1997). Apesar destes esforços, os mecanismos moleculares envolvidos na invasão tumoral são pouco conhecidos.

Estudos recentes investigaram o papel de receptores dos componentes da MEC em mediar interações entre células do glioma e o microambiente. Paulus e colaboradores (1996) demonstraram que a integrina $\alpha3\beta1$ é a mais expressa em gliomas e media a migração em laminina. Assim, as células dependem da matriz extracelular para efetuar o processo conhecido como invasão tumoral, no qual aderem à MEC adjacente, adquirem capacidade migratória e invadem o microambiente local, remodelando a MEC com o auxílio de enzimas proteolíticas como as metaloproteinases. (Kohn *et al.*, 1995). Considera-se que a invasão das células de glioma, no SNC adjacente, possui três processos: inicialmente aderem às proteínas de MEC, o que ocorre com mediação dos receptores de superfície celular; secretam proteases para degradar localmente a MEC; e, finalmente, migram ativamente para dentro do novo tecido (Goldbrunner *et al.*, 1998). Para ser efetuada esta digestão da matriz adjacente ao tumor, as células lançam mão das metaloproteinases, enzimas que degradam a matriz. Por isso, as metaloproteinases são bem mais expressas em gliomas em progressão do que em parênquima adjacente, sendo assim um dos fatores cruciais para o processo invasivo. (Kodera *et al.*, 2000). No experimento citado anteriormente os autores sugerem que estas enzimas digestivas possam vir a sofrer uma inibição de produção (*down-regulation*) por certos tecidos específicos como é o caso da Barreira Hemato-Encefálica.

É importante ressaltar que fenômenos como proliferação celular e invasão de tecidos adjacentes ou de outros tecidos não estão necessariamente associados, e parecem envolver e depender de certa proporcionalidade de diferentes proteínas de matriz. (Schiffer, Cavalla e Dutto 1997). É possível que a diferença entre a migração de células normais e tumorais esteja “no controle fino da matriz sobre esses processos” (De Clerck *et al.*, 1994).

Alguns trabalhos recentes têm evidenciado aspectos mais detalhados dessa interação de células de gliomas com o complexo multifuncional da matriz extracelular. Breyer e colaboradores (2000) demonstraram que o tratamento em ratos com um anticorpo contra a molécula de adesão CD44 inibiu a progressão tumoral nos gliomas implantados. Esta molécula de inserção transmembranar é caracterizada por talvez ser o principal mediador dos aspectos de migração e invasão. (Breyer *et al.*, 2000) Trabalhos também demonstraram que o padrão de

PGs é diferente nas células tumorais com diferentes potenciais metastáticos em fígado (Timar *et al.*, 1995). Outras moléculas, como as de adesão, também estão relacionadas ao processo de instalação da patologia, como é o caso de ICAM-1, um exemplo de molécula de adesão intercelular. Quando células de glioma são geneticamente modificadas para produzir quantidades diferentes de ICAM-1, há inibição tumoral e ativação de linfócitos T dos vários subtipos. (Kikuchi *et al.*, 1999).

Um interessante estudo de Reith e colaboradores (1994) feito em co-cultura de tecido nervoso de embrião de rato e células dos gliomas de rato BT4C e BT5C mostrou um evidente controle da proteína laminina na inibição da migração dessas células ao longo da superfície de tecido celular, o que não aconteceu quando outras proteínas foram adicionadas a co-cultura nas mesmas concentrações o que sugere que alterações na proporcionalidade dessas proteínas de matriz são capazes de alterar padrões de infiltrabilidade do glioma. As células tumorais, conforme sugerido, teriam maior dificuldade de digerir matrizes contendo laminina, o que poderia explicar a dificuldade que normalmente o glioma enfrenta para passar através da barreira hemato-encefálica e formar metástases em outras regiões do organismo, a despeito de sua grande capacidade de digerir e transformar matrizes com outras diferentes concentrações protéicas. Já Bernstein e Woodard não observaram células C6 no espaço intravascular da barreira hematoencefálica, cujo revestimento é basicamente fibronectina e laminina, mas foram bastante encontradas em contato com a fibronectina da membrana basal dos vasos na parte externa.

A MEC das substâncias branca e cinzenta do cérebro adulto consiste principalmente de gliocosaminoglicanos (GAGs), que formam as longas cadeias de polissacarídeos não ramificadas ligadas a um core protéico central para formar as moléculas de proteoglicanos (PGs). Um número extremamente grande e incomum de GAGs é expresso no sistema nervoso. Os GAGs tem sido classificados em quatro grandes grupos baseado em seus resíduos de açúcares: ácido hialurônico (AH), condroitin sulfato, keratan sulfato e heparan sulfato. Na MEC do cérebro, o ácido hialurônico é um GAG ubiqüitário que contém milhares de resíduos de açúcar não sulfatados e pode formar agregados com outros GAGs (Margolis e Margolis, 1993). A adesão da célula do glioma com o ácido hialurônico do tecido adjacente parece ter relevante importância no processo de instalação do tumor. A adesão ao AH é mediada pelo receptor CD44, mas também pode ser influenciada por outros GAGs ligados a superfície

celular. (Knupfer *et al*, 1999) No sistema nervoso em desenvolvimento, GAGs e PGs estão envolvidos em diversas interações celulares. Além dos efeitos diretos sobre a mortalidade celular e crescimento neurítico, os GAGs podem controlar a proliferação e mobilidade celular através de ligação, estoque, estabilização e apresentação local de fatores de crescimento. Por exemplo, heparan sulfato PG pode se ligar ao fator de crescimento de fibroblasto (bFGF) e protegê-lo contra degradação (Ruoslahti e Yamaguchi, 1991). Além desse efeito, a ligação do bFGF ao seu receptor é dependente de uma ligação prévia do bFGF ao heparan sulfato (Yayom *et al.*, 1991). O heparan deve possuir uma carga (dada pela sulfatação) e uma concentração ótima para que potencialize e não diminua o efeito desta citocina, pois tanto em baixas como em altas concentrações parece inibir a atividade e a fosforilação do receptor de bFGF. (Fannon *et al*, 2000). Além desse modelo bem estabelecido para interações células-substrato através das integrinas, atualmente existem importantes evidências para o papel de PG de superfície celular na modulação da adesão celular a proteínas da MEC (Faassen *et al.*, 1992).

1.6. O Modelo do Clorato de Sódio para o Estudo de Gag's

O sal Clorato de sódio é um potente inibidor da enzima adenililsulfotransferase. Esta enzima é fundamental para a formação de 3-fosfoadenililsulfato no complexo de Golgi e a sua inibição resulta na produção de moléculas de PGs com GAGs muito pouco sulfatados (Greve *et al.*, 1988; Alvarez-Silva e Trentin, 1996). Estudos anteriores demonstraram que a adição de clorato altera a afinidade da heparina/heparan-sulfato pela citocina bFGF, (Fannon *et al*, 2000).

O clorato de sódio pode ainda causar efeitos de inibição de transferases nas células, dependendo do tipo celular estudado. Clorato de sódio inibe reações de sulfatação protéica (95% das reações), interferindo em processos como o da adição de sulfato ao procolagênio, assim como inibe sulfatação de tirosina e mesmo de carboidratos. Apesar disso, o clorato não altera a síntese protéica em uma grande variedade de linhagens celulares nem parece ter toxicidade na dose utilizada para as reações de subsulfatação (50-100nM). (Baeuerle *et al*, 1986; Jukkola *et al*, 1990).

A subsulfatação do heparan sulfato induzida pelo clorato de sódio também pode ter a capacidade de reduzir a afinidade da superfície celular para certas enzimas, como para a

lipoproteína lipase, o que neste caso diminui a degradação de lipídios pelos adipócitos. (Hogewerf *et al*, 1991). Outra enzima afetada parece ser a enzima fosfodiesterase específica do AMPc em culturas de células de Sertoli. Esta enzima é, em parte, regulada de modo indireto pelo padrão de síntese de proteoglicanos, o que causa aumento de secreção de FSH induzido por estradiol. (Phamantu *et al*).

1.7. Trabalhos Anteriores do Laboratório

Trabalhos anteriores do laboratório demonstraram que a redução na sulfatação de glicosaminoglicanos, promovida pelo clorato de sódio inibe a proliferação celular da linhagem leucêmica monocítica WeHi 3B de modo dose dependente (Alvarez-Silva e Trentin, 1996). Alvarez-Silva e Trentin (1996) sugerem que modificações na estrutura de moléculas proteoglicanos, susceptíveis ao tratamento com clorato de sódio, poderia influenciar profundamente o padrão de crescimento celular. Supõe-se que a sulfatação padrão dos GAGs é de significância patológica. O nível de sulfatação do heparan sulfato proteoglicano (HS-PG) regula a atividade mitogênica de FGF em células de câncer de mama humano (Alvarez-Silva e Trentin, 1996).

Estudos *in vitro* (Mendes de Aguiar *et al*, 1999 e 2000) testaram a influência do Clorato de Sódio com relação a aspectos do metabolismo de células C6. Nestes estudos, o Clorato de Sódio inibiu de forma dose-dependente a adesão e a proliferação de células C6, sendo utilizadas as concentrações de 10, 50, 100 e 200 mM. Por outro lado, a toxicidade do Clorato de sódio nas doses de 50 e 100 mM para estas células foi considerada não significativa, demonstrada por ensaio de mortalidade celular (Sitox-Green), o que demonstrou que os efeitos anti-adesivos e anti-proliferativos observados não estavam ocorrendo por indução morte celular (cascata bioquímica apoptótica), mas por interferência em pontos de rotas do metabolismo celular que envolvessem estes processos de adesão e proliferação.. Com estudos de imunohistoquímica verificou-se que o uso do clorato de sódio induziu reorganização da matriz extracelular no que se refere às proteínas laminina e fibronectina. Com relação a esta última, foi demonstrado por técnica de Werstern Blott que estava ocorrendo um aumento de sua síntese. Acreditamos que esses fenômenos se devam principalmente à uma tentativa principalmente no

sentido compensatória, pela propriedade que tem o Clorato em interferir na sulfatação de glicosaminoglicanos, moléculas, como já enfatizado, com ativa importância na regulação e função da matriz extracelular.

OBJETIVOS

2.0. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Verificar a influência das proteínas da matriz extracelular e de glicosaminoglicanos na adesão de células C6, *in vitro*, como também o efeito do sal clorato de sódio sobre a progressão do glioma, *in vivo*.

2.2. Objetivos Específicos:

- a) Estudar, *in vitro*, a influência de proteínas de matriz como laminina, fibronectina e colágeno tipo IV na adesão de células C6, bem como o efeito de diferentes proporções entre elas.
- b) Verificar, *in vitro*, o efeito dos glicosaminoglicanos Heparina (analogamente a Heparan-sulfato) e Condroitin-sulfato na adesão de células do glioma C6 sobre a matriz extracelular (MEC)
- c) Analisar, *in vivo*, utilizando ratos Wistar como modelo, o efeito do clorato de sódio na formação e progressão tumoral do glioma C6, utilizando inoculação intracerebral através de experimentos de sobrevivência ou de análises anatomo ou histopatológicas comparativas.
- d) Verificar a influência de sensibilizações em animais com células tratadas ou não com clorato de Sódio a propósito de verificar a ação do sistema imune no desenvolvimento posterior dos tumores.
- e) Analisar à luz da progressão tumoral o quadro sintomático e locomotor dos animais acometidos pelo tumor, e o efeito da inoculação de C6 pré-tratada sobre os mesmos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.0. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados cerca de 150 ratos Wistar machos (com três e quatro meses de idade), pesando entre 250 e 320 g, provenientes do biotério central e mantidos, até o final dos experimentos, no biotério setorial do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, num ciclo claro/escuro de 12h (das 6:00 às 18:00 no horário solar). Os animais tiveram livre acesso a água e a ração, exceto durante a realização dos experimentos. Os grupos controle e experimentais (em um número variando de 6 a 11 para cada grupo) foram escolhidos aleatoriamente.

3.2. Cultura de células

As células do glioma C6 (gentilmente cedidas pelo Dr. Vivaldo Moura Neto, do departamento de Morfologia, U.F.R.J., e acondicionadas em galão de nitrogênio líquido) foram crescidas em garrafas de cultura de 25cm², na presença de meio de cultura Dulbecco com modificações (DMEM, Sigma, Saint Louis, USA) acrescido de penicilina (0,5U/ml), estreptomicina (0,5 mg/ml) e suplementado de 5% de soro fetal bovino (SFB) (todos Gibco BRL, New York, USA). As células foram manipuladas esterilmente sob fluxo laminar e estocadas em atmosfera com 95%-de umidade, 5% CO₂ e 37°C. Após a confluência as células foram tripsinizadas (tripsina a 0,125%, ácido tetraacético etileno diamino [EDTA] em tampão fosfato salina [PBS] pH 7,4; todos Gibco BRL) à temperatura ambiente, durante 1 min. A reação foi paralisada pela adição de meio de cultura contendo 5% de SFB. Após 3 lavagens em PBS, as células serão semeadas a uma densidade de 10⁶ células/garrafa 25cm². Foram utilizadas células de no máximo 15 passagens sucessivas a partir da amostra inicial recebida.

3.3. Ensaio de adesão celular

O ensaio de adesão celular foi realizado como descrito previamente por Pucillo *et al.* (1993). Foram utilizadas monocamadas confluentes do glioma C6. Os ensaios foram realizados em placas de ELISA (Corning Costar, New York, USA), previamente incubadas com várias concentrações (0,1; 0,5 e 1,0 µg/poço) de laminina, fibronectina ou colágeno IV (12 horas, 4°C, todos Gibco BRL). Foram analisadas também várias combinações dessas proteínas. Após duas lavagens com PBS, os poços foram saturados durante 1 hora com 2% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma) em PBS. Após nova lavagem com PBS, as células, juntamente com os proteoglicanos (heparina/condroitin-sulfato) em diferentes concentrações (10µg, 25µg, 50µg, 100µg, 150 µg/poço) foram plaqueadas a uma densidade de 5×10^4 células/poço durante 2 horas nas condições de cultivo. As células não aderidas foram removidas por lavagem com PBS e as aderidas fixadas durante 10 min. com paraformaldeído a 4% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), e a seguir coradas durante 10 min. em cristal violeta a 0,5% (Merck, Alemanha) em 20% de metanol (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil). Após nova lavagem com PBS, o corante foi eluído em 0,1M de tampão citrato de sódio (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), pH 4,2, em 50% de etanol (Reagen). A quantidade de corante eluída, foi avaliada por leitura em espectrofotômetro a 540nm (Leitor de ELISA Biotech Instruments). Os valores de absorbância são diretamente proporcionais à quantidade de células aderidas. Para a comparação de vários ensaios em triplicatas de adesão, foi obtida uma média da triplicata que correspondeu ao controle de cada grupo(ex: FN + Hep 0 ug; Col + Condroitin 0 ug). A média desta triplicata em cada experimento foi atribuído o valor de 100%(controle) e os valores das outras triplicatas foram calculados individualmente na função de porcentagem em relação a este controle dentro de cada experimento. A variância do controle foi analisada dentro de cada experimento, sem que os valores de absorbância fossem reduzidos a porcentagens. Tomou-se então as variâncias de experimentos diferentes que estavam sendo comparados para o cálculo da variância total do controle em forma de média mais a própria variância das variâncias de diferentes

experimentos. Desta forma, puderam ser comparados resultados de adesão de experimentos diferentes, sendo que para cada grupo experimental foram feitos pelo menos 6 triplicatas em dois experimentos diferentes.

Foram feitos diferentes protocolos para se verificar a influência de GAG's na adesão de células C6, a saber: um protocolo onde as proteínas de matriz (laminina, fibronectina e colágeno IV) foram colocados na placa 12 horas antes das células, e juntamente com as células foram adicionadas diversas concentrações do glicosaminoglicano; um protocolo onde o glicosaminoglicano (também em diversas concentrações) era pré-incubado juntamente com as proteínas de matriz extracelular 12 horas antes da adição das células (GAG incubado com as proteínas de matriz) e ainda, um protocolo onde o glicosaminoglicano nas diferentes doses foi pré-incubado por uma hora juntamente com as células por uma hora a 37°C em PBS-glicose, e então as células, já centrifugadas sem clorato em meio DMEM-binding, foram postas na placa para a adesão (gag incubado com a célula)

3.4. Implantação *in vivo* subcutânea do Glioma C6

Realizada em ratos (250 g). Foram inoculadas 2×10^7 células, em meio de cultivo, no flanco de cada animal. Foi feito semana a semana o acompanhamento do crescimento tumoral que pode ser observado pela presença da massa tumoral na região da aplicação. No grupo tratado com Clorato de Sódio utilizou-se a aplicação da substância nos quatro dias subsequentes à implantação das células no mesmo sítio de aplicação das células, perfazendo nos animais uma concentração sanguínea após a absorção de 50mM. Os animais foram necropsiados 30 dias após a inoculação. Foram mensurados os raios médios da massa tumoral encapsulada dos grupos experimentais com régua simples após excisão da mesma.

3.5. Implantação *in vivo* Intracerebral de Células C6 (IC) na estereotaxia:

Os animais foram anestesiados profundamente com Pentobarbital Sódico a 50 mg/kg, (HYPNOL-Cristália), e a seguir colocados no aparelho estereotático (David Kopf Instruments) O aparelho é mostrado na figura 1 dos materiais e métodos. A pele da cabeça foi, então, incidida e a gálea aponeurótica removida de cima da sutura do bregma. O crânio foi perfurado

com uma broca odontológica de 1mm e a dura-mater exposta a uma distância de ± 4.0 mm laterais ao bregma, na area ocupada pelos gânglios da base, no núcleo caudado-putâmen, o qual representa funcionalmente uma área de controle motor simples, sendo principalmente um centro dopaminérgico (conforme indicação de coordenadas do atlas estereotaxico de Paxinos e Watson). Com o auxílio de uma microseringa (Hamilton), foram inoculadas 10^6 células (em 5 μ l de meio de cultivo) a uma profundidade de 4mm da superfície do crânio. Os animais foram necropsiados 10 dias após a inoculação e foi feita análise histopatológica das massas .

3.6. Fixação de cânulas intracerebrais, inoculação do glioma C6 e posterior tratamento via cânula.

Para os estudos de inibição do tumor pós-implantação, utilizamos o método de introdução de cânulas seguindo a mesma técnica descrita acima, com a diferença de que as coordenadas usadas foram 4,0 mm a direita do bregma e 3,5 mm de profundidade em relação a calota óssea cranial. As cânula foram feitas a partir de agulhas 25 \times 6 limadas com 14 mm de comprimento. Após feito o furo na calota para a cânula, foram feitos dois outros furos , um anterior e outro posterior a uma distância de 0,8 cm para a fixação de parafusos de bitola 1,0 mm. Os parafusos eram fixados a uma profundidade por volta de 1,5 mm da calota craniana superior. Um revestimento de acrílico (Acrilex) era colocado na superfície óssea exposta, a fim de que , fixado aos parafusos, a calota craniana e a cânula, não permitisse o deslocamento desta última. Após o procedimento cirúrgico, os animais permaneciam 5 dias no biotério até que fosse efetuado outro procedimento. Isso permite no transcurso do experimento uma redução de variáveis intervenientes como inflamação e edema local, estresse pós-traumático e queda de amplitude de resposta imune pós-operatória. Após 5 dias, foram inoculadas no parênquima cerebral 10^5 células C6 em 5 μ l de meio DMEM com 5% de SBF com o auxílio de uma agulha odontológica MISE, com 16 mm de comprimento acoplada a um tubo de silicone de volume e comprimento previamente estabelecido. O tubo de silicone era conectado a uma seringa de insulina de 1ml contendo o meio com as células. O tempo de injeção utilizado foi de aproximadamente 5 minutos por animal. Nos cinco dias consecutivos uma vez ao dia (sigla usada em terapêutica: SID) foram feitas mais aplicações via cânula de 4 μ l de solução de

Clorato de Sódio a 0,1 M ou veículo (PBS) (Ver figura 3). Em todos os procedimentos de inoculação intracanalicular foi usado o éter como sedativo via inalação. Entre um animal e outro, as agulhas, seringas e tubo de silicone eram lavados duas vezes com álcool 70% e posteriormente três vezes em água destilada a fim de reduzir a probabilidade de contaminação micológica ou bacteriana por prática do procedimento. As agulhas e o silicone eram conservados imersos em álcool 70% a 4°C.

3.7. Análise de sobrevivência

Animais inoculados eram acondicionados em caixas padrão de 33 X 40 cm contendo de 4 a 5 animais cada nas condições descritas acima e eram observados todos os dias para a constatação da data de seu óbito a partir do dia de inoculação das células tumorais. Os animais que sobreviveram por mais de 60 dias foram sacrificados e submetidos a análise patológica.

3.8. Confecção de Lâminas e Análise histopatológica.

Os animais (em todos os protocolos experimentais) foram sacrificados com indução de anestesia profunda com pentobarbital sódico (Hypnol, Crystalia). Após o sacrifício dos animais inoculados seus cérebros foram dissecados e removidos da caixa craniana. Daí, permaneceram 10 minutos em fixador Bodian de SNC (5% ácido acético glacial, 5% formaldeído comercial, 90% álcool 80%), para que adquirissem uma textura mais adequada para a manipulação. Foi construída uma guilhotina, num aparato cúbico de madeira, com dois pregos quadrangulares de cobre paralelos colocados ortogonalmente com uma lâmina presa entre eles e foi tracejada uma linha na madeira ortogonal em relação aos dois pregos no meio deles (ver figura 4). Nesta linha foram colocados os cérebros de maneira a serem justapostos a linha tracejada e o espaço inter-hemisferial. Ao abaixar a lâmina de encontro a madeira, procederam-se os cortes coronais exatamente no ponto de inoculação do tumor ou veículo. Desta maneira, assegurou-se que todos os grupos tiveram o mesmo ângulo de corte inicial, a partir do qual foram feitos os outros cortes. Após este corte diretriz, os cérebros foram novamente imersos em Bodian, em um volume não inferior a dez vezes o volume total dos cérebros do grupo por 48 horas. Os cérebros foram depois lavados em água destilada e 4 vezes em PBS pH 7.4, permanecendo 30 minutos

em cada lavagem. Foram lavados novamente em água destilada e conservados em álcool 70%. Para a histopatologia os cérebros foram imersos em alcoolaturas (concentrações alcoólicas diluídas em água) decrescentes e então embebidos em parafina. Foram realizados três cortes por cérebro ao micrótomo (espessura de 5 μ m), seguindo o mesmo ângulo de corte da guilhotina. Um corte a altura daquele já realizado pela guilhotina e outros dois 1mm anteriores e posteriores ao primeiro. Foi procedida logo após a coloração HE., sendo considerados para comparação dentre os três o corte que contivesse a massa tumoral mais expressiva a microscopia. Na morfometria do material analisado foram utilizadas lentes objetiva e ocular de dez vezes em microscópio da marca *Studar*. A área média dos tumores foi medida por um retículo ocular previamente calibrado composto por 100 divisões, multiplicando-se as medidas em micrômetros nas coordenadas supero-inferior e latero-lateral, sendo que para a delimitação espacial da área tumoral foi considerado o primeiro núcleo de aspecto tumoral situado entre o tecido sadio e o tecido tumoral como ponto de referência inicial. Para ser calculada a área dos cortes coronais de cérebros que continham a maior área tumoral de cada indivíduo foi utilizado um paquímetro sobre o corte histológico nas coordenadas supero-inferior e latero-lateral, as quais foram multiplicadas. A distância supero-inferior foi medida a partir de 2mm do arco interemisferial, e a distância latero-lateral foi medida na coordenada de 5mm a partir do ponto 0 estabelecido pelo atlas estereotaxico de Paxinos e Watson (1998). Assim, foi também utilizada como comparação entre grupos a razão entre a área tumoral e a área total da secção coronal correspondente.

3.9. Hemogramas

A coleta de sangue para a realização dos hemogramas foi realizada por punção cardíaca com uma agulha de 16 mm em uma seringa contendo heparina tripotássica em animais anestesiados com éter. Estes animais foram reservados dentro dos protocolos experimentais unicamente para a feitura de hemogramas, após a qual foram descartados. O sangue obtido (homogeneizado com a heparina) foi conservado a 4° C por no máximo oito horas até que fosse feita a leitura em aparelho da marca Colter modelo Dess II.

3.10. Arena de Exploração

Foi utilizado para a avaliação clínica e de locomoção dos animais afetados uma arena de exploração quadrada de madeira de 95 cm de lado e 31,5 cm de altura (ver figura 3 dos materiais e métodos). A caixa tinha 9 quadrados delineados em vermelho com áreas idênticas (21 cm de lado). Os animais foram colocados no quadrado central e suas atividades na caixa observadas por 5 minutos. Os parâmetros comportamentais e sintomáticos observados foram:

- a) Número de quadrados explorados (o animal deveria mover ao menos três patas para dentro do quadrado)- parâmetro de atividade motora.
- b) Número de explorações verticais - parâmetro de atividade exploratória.
- c) Quantidade de bolos fecais - índice de emocionalidade (baseado em Archer, 1973).
- d) Presença ou não de paresia (movimentação comprometida) nos membros contralaterais à inoculação IC.

Presença ou não de hipersecreção lacrimal ao redor dos olhos, indicativo de glaucoma e possível aumento da pressão hidrostática intracraniana. Todas as sessões do teste e observações foram procedidas com intervalos de 7 dias após a inoculação intracerebral do tumor contadas a partir da data desta última, para que fosse evitada a habituação e memorização das condições da arena.

Para a realização dos testes na Arena de Exploração tivemos por vezes que submeter alguns grupos a mais de uma exposição ao teste, por isso de início fizemos uma padronização para verificar se com o intervalo de uma semana entre uma e outra exposição não ocorreria o fenômeno conhecido como Habituação, isto é, o reconhecimento fixado na memória por parte dos sujeitos e consequentemente uma diminuição da atividade exploratória (essencialmente de reconhecimento) quando submetidos ao teste por uma segunda vez a um intervalo de tempo relativamente pequeno de dias. Avaliamos que, em sendo a arena de exploração um teste com estímulos neutros, a motivação para que o animal fixasse na memória que não haveria a uma segunda exposição necessidade de nova exploração estaria bastante reduzida, tendo em vista que os enagramas de um determinado fato são mais rapidamente armazenados na memória se o sujeito do teste sofrer ou estímulos nocivos (dor, por exemplo) ou prazerosos (recompensas de alimento por exemplo)(Manning, A. ,1979) Além do mais, a atividade exploratória constitui uma tendência natural e extremamente adaptativa do animal.(Graeff *et al*, 1996) e a tendência

natural do animal perante um ambiente novo é explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado por este novo ambiente(Montgomery,1955).

Realizamos uma sequência de dois testes na nossa Arena com 07 sujeitos com o intervalo de uma semana e verificamos não haver diminuição significativa tanto no número de quadrados explorados como no número de levantamentos (*rearings*) na exploração da arena no segundo teste. Consideramos assim válida nossa hipótese inicial para a realização dos testes relativos à progressão tumoral considerando como mínimo o efeito da habituação.

3.11. Grupos experimentais

1º grupo(C6 subcutâneo+ clorato): Animais foram inoculados subcutaneamente (SC) com células C6. Durante quatro dias consecutivos, a começar pelo dia subsequente à inoculação, os animais foram tratados com clorato de sódio aplicado no local da inoculação (50mM).

2º grupo-controle(C6 subcutâneo sem tratamento com clorato) : Animais foram inoculados subcutaneamente com células C6. Durante quatro dias consecutivos, a começar pelo dia subsequente à inoculação, os animais foram tratados com tampão fosfato salina (PBS).

3º grupo(C6 IC pre-tratada com clorato em veículo normal): Os animais foram inoculados intracerebralmente (IC) com células C6 (5×10^5)previamente tratadas por 48 horas em cultura com 50mM de clorato de sódio (em um volume de 5ul de meio DMEM). Alguns animais foram observados para constatação de sobrevivência pós-inoculação e para os testes comportamentais e outros foram sacrificados aos 10 dias de inoculação e tiveram seus cérebros removidos para a confecção das lâminas da histopatologia . Seguindo a morte natural ou o sacrifício dos animais foram analisados seus cérebros à macroscopia e à histopatologia, respectivamente, para que fosse constatada (ou não) a presença de massa tumoral.

4º grupo-(C6 IC pre-tratada com clorato em veículo contendo clorato): Os animais inoculados intracerebralmente com células C6 submetidas ao tratamento com a substância ,e ainda , no momento da inoculação no cérebro sendo também postas em DMEM contendo uma concentração de 50mM, e daí seguindo-se o mesmo protocolo descrito acima para a feitura de lâminas e para o grupo do teste de sobrevivência. Os restantes tiveram seu sangue colhido por

punção cardíaca em seringa de 10 ml contendo EDTA para a realização de hemogramas a fim de avaliar parâmetros hematológicos ao longo do processo de progressão tumoral.

5º grupo-(C6 IC sem pre-tratamento com clorato em veículo normal): Animais inoculados com células C6 sem pré- tratamento em DMEM contendo clorato de sódio e inoculadas intracerebralmente em DMEM sem clorato.

6º grupo (tratamento com clorato pós-inoculação via cânula): Os animais submetidos a estereotaxia para a implantação de cânula e então a inoculação de 10^5 células C6 via cânula. O Clorato de sódio a 100mM em 4ul de PBS foi inoculado no mesmo local uma vez ao dia durante os 5 dias subsequentes. Alguns animais foram sacrificados aos dez dias para a feitura de lâminas para a histopatologia , enquanto outros foram submetidos aos testes de sobrevivência e arena de exploração.

7º grupo-controle (tratamento com veículo pós-inoculação de C6 via cânula): Os animais foram submetidos a cirurgia estereotática para a implantação de cânula e posteriormente à inoculação de células C6 via cânula, conforme descrito acima. Foram injetados 4ul de veículo no local uma vez ao dia por 5 dias. O grupo foi dividido como descrito acima.

8º grupo: (sensibilizados C6 pré-tratada com clorato I .P.+ inoc. IC):Os animais foram sensibilizados intraperitonealmente com $0,5 \times 10^5$ células C6 pré-tratadas com clorato de sódio (100mM-48h) em PBS pH 7,4 por duas vezes com oito dias de intervalo. Oito dias depois foram submetidos a inoculação intracerebral de C6. Alguns animais foram sacrificados aos 10 dias de inoculação para confecção de lâminas para a histopatologia e outros foram avaliados nos testes de arena de exploração e de sobrevivência.

9º grupo-controle (sensibilizados C6 I.P. + inoc.IC): Os animais foram sensibilizados intraperitonealmente conforme acima com células C6 sem tratamento prévio com clorato de sódio, e foram divididos conforme o critério acima descrito.

10º grupo-controle operado (sham) : Para algumas técnicas como a feitura de Hemogramas e as análises comporetamentais foi utilizado este grupo, o qual foi submetido ao trauma cirúrgico com a inoculação de 5 ul de veículo.

3.12. Análise estatística

A diferença entre os grupos experimentais foi analisada pelos testes ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparações com um único grupo controle ou pelo teste de Newman – Keuls quando foram comparados vários grupos entre si. Utilizou-se o teste T quando apenas dois grupos estavam sendo comparados. O teste de Lockgrank foi utilizado para a comparação de curvas de sobrevivência e o teste Qui-quadrado para comparações simples de frequência esperada. Foi utilizado em todos os testes um intervalo de confiança de 95 %. Foi empregada a notação (*) de significância quando P foi menor que 0,05 ($P < 0,05$) e (**) quando P foi menor que 0,01 ($P < 0,01$) como diferença altamente significativa, quando foram comparados grupos testados com o grupo controle. Foi utilizada a notação S quando houve entre grupos testados em um mesmo protocolo experimental uma diferença em que P fosse menor que 0,05. Na descrição dos resultados expressamos as médias dos experimentos seguida do respectivo desvio padrão (+/- o número do desvio), enquanto nos gráficos e figuras foi ilustrado o erro padrão da média em forma de barras verticais.



Figura 1- Inoculação através da cânula

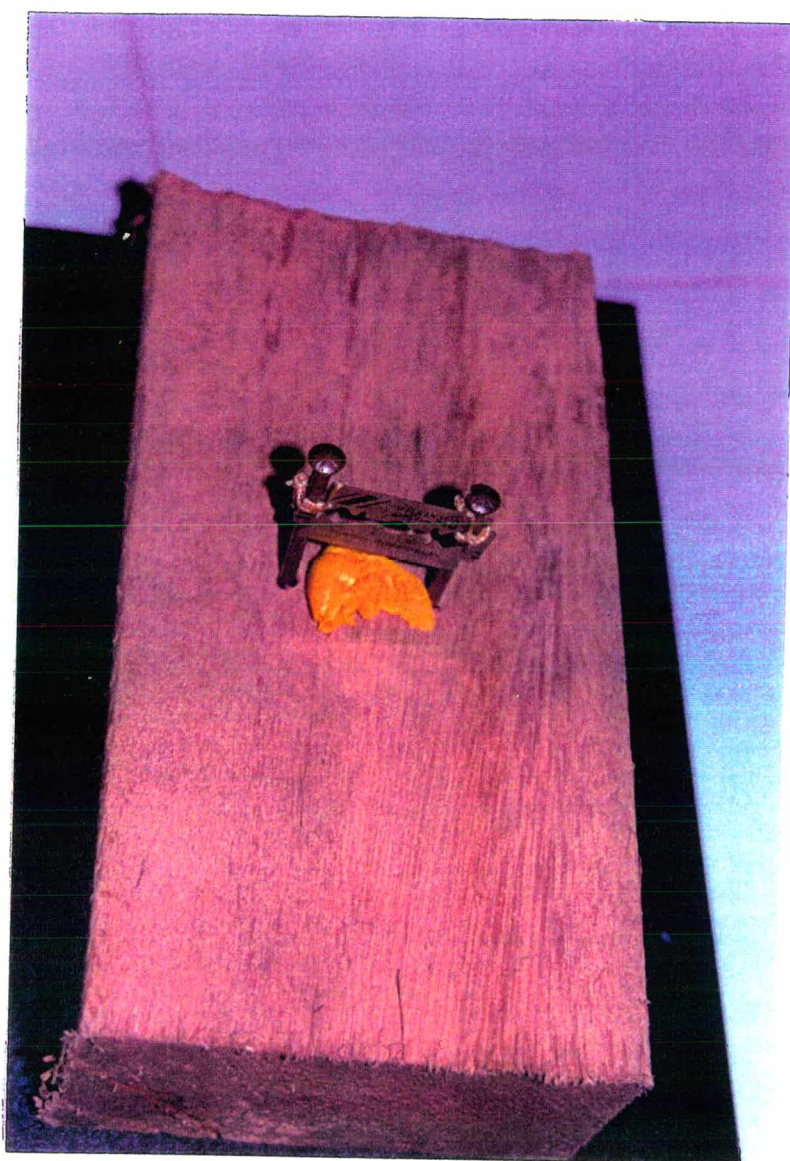


Figura 2- Aparelho de padronização de Cortes Coronais de Encéfalos

RESULTADOS

3.0. RESULTADOS

A) Ensaios *in vitro*

3.1. Ensaios de Adesão celular

Com o objetivo de estudar o envolvimento das proteínas da matriz extracelular (MEC) sobre a adesão do glioma C6, realizamos ensaios *in vitro* de adesão celular. Para padronizarmos a técnica, realizamos curvas de concentração (0,1, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/poço}$) das proteínas da MEC (laminina, fibronectina e colágeno tipo IV) como substrato para a adesão (Fig. 1). Optamos a partir destes resultados por utilizar a concentração de 0,5 μg como concentração padrão para nossos ensaios de adesão.

Para verificarmos o efeito das proteínas da MEC na adesão do glioma C6, realizamos ensaios utilizando diferentes combinações de laminina, fibronectina e colágeno tipo IV (Fig. 2). Como controle interno do experimento, fizemos a combinação das três proteínas, cada uma na concentração de 0,5 $\mu\text{g/poço}$. Observamos que tanto o aumento da concentração de uma das três proteínas da MEC (colágeno tipo IV ou laminina ou fibronectina) para 1 $\mu\text{g/ml}$, quanto a sua redução para 0,1 $\mu\text{g/poço}$ não alterou significativamente a adesão de C6. Este resultado pode sugerir que, a presença dessas três proteínas da MEC juntas em um substrato, suporta variações na sua concentração sem que se altere significativamente o efeito adesivo.

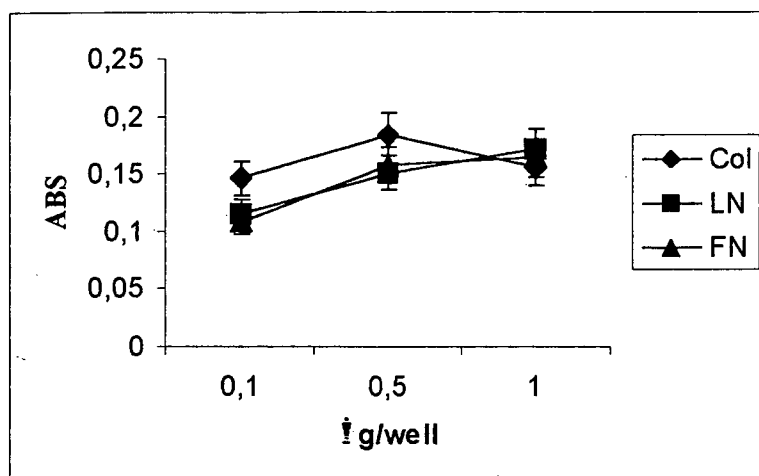


Figura 1: Curva de concentração das proteínas de matriz extracelular sobre a adesão de células C6. Os poços da placa de ELISA foram recobertos com diferentes concentrações de colágeno tipo IV (COL), laminina (LN) e fibronectina (FN). Após a tripsinização, as células foram plaqueadas e incubadas durante 2 horas sobre o substrato. As células não aderidas foram removidas por lavagem e as que permaneceram aderidas, foram quantificadas por coloração com cristal violeta como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados são expressos em absorbância a 540 nm. Cada ponto representa media de três experimentos realizados em triplicata \pm erro padrão.

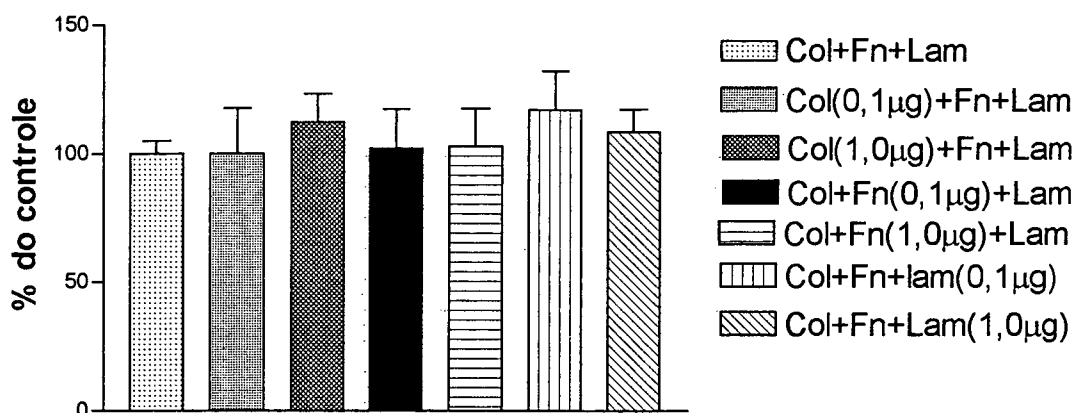


Figura 2: Efeito da Combinação das Proteínas da MEC na Adesão de C6. Foram realizados ensaios de adesão celular em placas de ELISA com incubação previa por 12 horas de colágeno IV (COL), laminina (LAM) e fibronectina (FN), nas concentrações indicadas no gráfico. Utilizamos como concentração padrão 0,5 mg/poço. O ensaio foi realizado como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados foram obtidos em absorbância a 540nm sendo expressos em porcentagem do controle (adesão sobre col + Lam + Fn a 0,5 mg/poço) e correspondem a média de dois experimentos feitos em triplicatas. A barra vertical corresponde ao erro padrão. O teste estatístico foi realizado pelo ANOVA com intervalo de confiança de 95%, sendo utilizado posteriormente o teste de Dunnett de comparação de grupos com o controle. (*) $p < 0,05$, (* *) $p < 0,01$. Não foram observadas alterações significativas na adesão entre diferentes protocolos.

Diante dos resultados acima, decidimos analisar os efeitos dos GAGs: heparina (Fig. 3) e condroitin-sulfato (Fig. 4) na adesão do glioma C6 sobre as proteínas da MEC.

Verificamos que a heparina, quando adicionada no momento do plaqueamento das células, alterou a adesão de C6 de modo diferenciado e específico de acordo com cada uma das três proteínas da MEC estudadas (Fig. 3). A Heparina estimulou de modo dose dependente a adesão sobre colágeno tipo IV, com aumento significativo com as concentrações de 25 (120% \pm 20,4 %), 50 (121 % \pm 18,1 %), 100 (141% \pm 23,13%) e 150 μ g/poço (133,5 % \pm 2,51%), em relação ao controle (100%), sem heparina. O aumento da adesão nos pontos de 10 μ g/poço não foi significativo (Fig.3 A). Heparina não alterou significativamente a adesão de C6 sobre fibronectina (Fig. 3 B) e nem sobre a combinação das três proteínas (Fig. 3 C) em nenhuma das concentrações estudadas. Por outro lado, observamos que heparina inibiu de modo dose dependente a adesão das células do glioma em laminina (Fig. 3 D). Verificamos redução significativa na adesão com as concentrações de 25 (86,96 % \pm 14,77 %), 50 (83,23 % \pm 6,22%) 100 (70,45% \pm 8,16%) e 150 μ g/poço (60,16% \pm 3,59 %) de heparina, em relação ao controle sem heparina.

De outro modo, a adição de condroitin-sulfato, inibiu a adesão de C6 tanto à laminina, quanto à fibronectina e colágeno tipo IV e à combinação das três moléculas (Fig. 4). Esse efeito apresenta uma tendência dose-dependente e pode sugerir que condroitin-sulfato esteja impedindo a interação das proteínas da MEC com os receptores de superfície celular, inibindo a adesão. Condroitin-sulfato reduziu significativamente a adesão de C6 ao colágeno tipo IV nas concentrações de 25 (47,73 % \pm 6,05 %), 50 (49,7 % \pm 5,48 %), 100 (65,45% \pm 7,05 %) e 150 μ g/poço (53,75 % \pm 19,05%) (Fig. 4 A). Por outro lado, condroitin-sulfato inibiu significativamente a adesão em laminina nas concentrações de 25 (75,43 % \pm 2,59 %), 50 (1,42 % \pm 12,41%), 100 (75,66 % \pm 12,01%) e 150 μ g/poço (47,95% \pm 7,00 %) (Fig.4 B); em fibronectina nas concentrações de 10 (65,12 % \pm 4,3 %), 25 (78,93 % \pm 11,25 %), 50 (63,66 % \pm 7,64 %), 100 (78,26 % \pm 14,11 %) e 150 μ g/poço (70,55 % \pm 12,91 %) (Fig.4 C) e à combinação das três proteínas nas concentrações de 10 (61,26 % \pm 3,74 %), 25 (68,35 % \pm 14,86 %) e 150 μ g/poço (75,52 % \pm 10,43 %) (Fig.4 D).

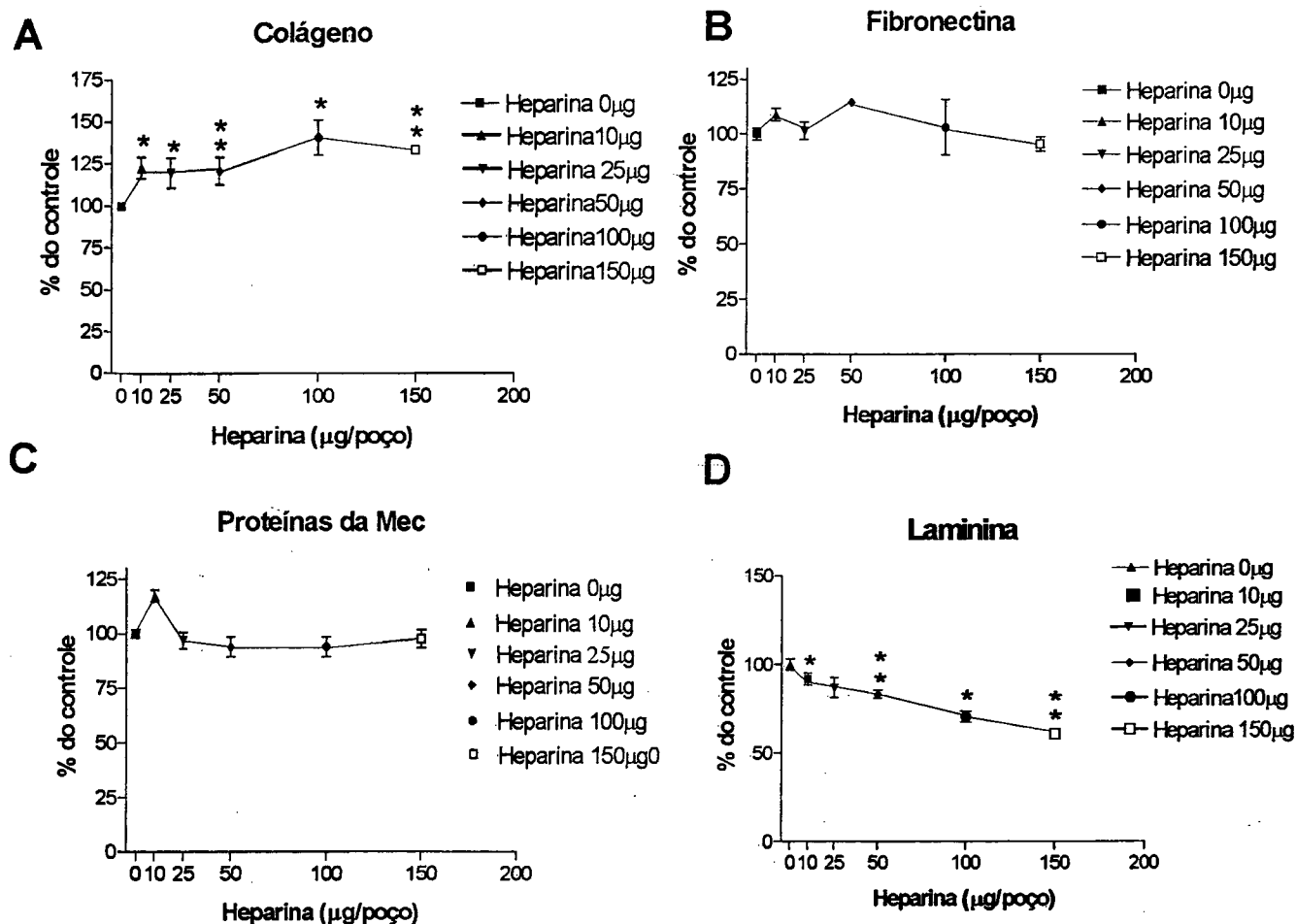


Figura 3: Efeito de Heparina na Adesão de C6 sobre as Proteínas da MEC. Foram realizados ensaios de adesão celular em placas de ELISA com incubação previa por 12 horas de colágeno IV (col), laminina (Lam) e fibronectina (Fn), nas concentrações indicadas no gráfico. Utilizamos como concentração padrão 0,5 μg/poço. O ensaio foi realizado como descrito nos Materiais e Métodos. A heparina foi acrescentada no momento do plaqueamento das células. Os resultados foram obtidos em absorbância a 540nm sendo expressos em porcentagem do controle (ausência de heparina) e representam a média de três experimentos feitos em triplicata. Os gráficos A, B, C e D, representam, respectivamente, os efeitos da heparina na adesão de C6 em Colágeno IV, Fibronectina, Proteínas da Mec (as três proteínas semeadas conjuntamente) e Laminina. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA com intervalo de confiança de 95%, e posteriormente o teste de Dunnett de comparação de grupos com o controle. A barra vertical corresponde ao erro padrão. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

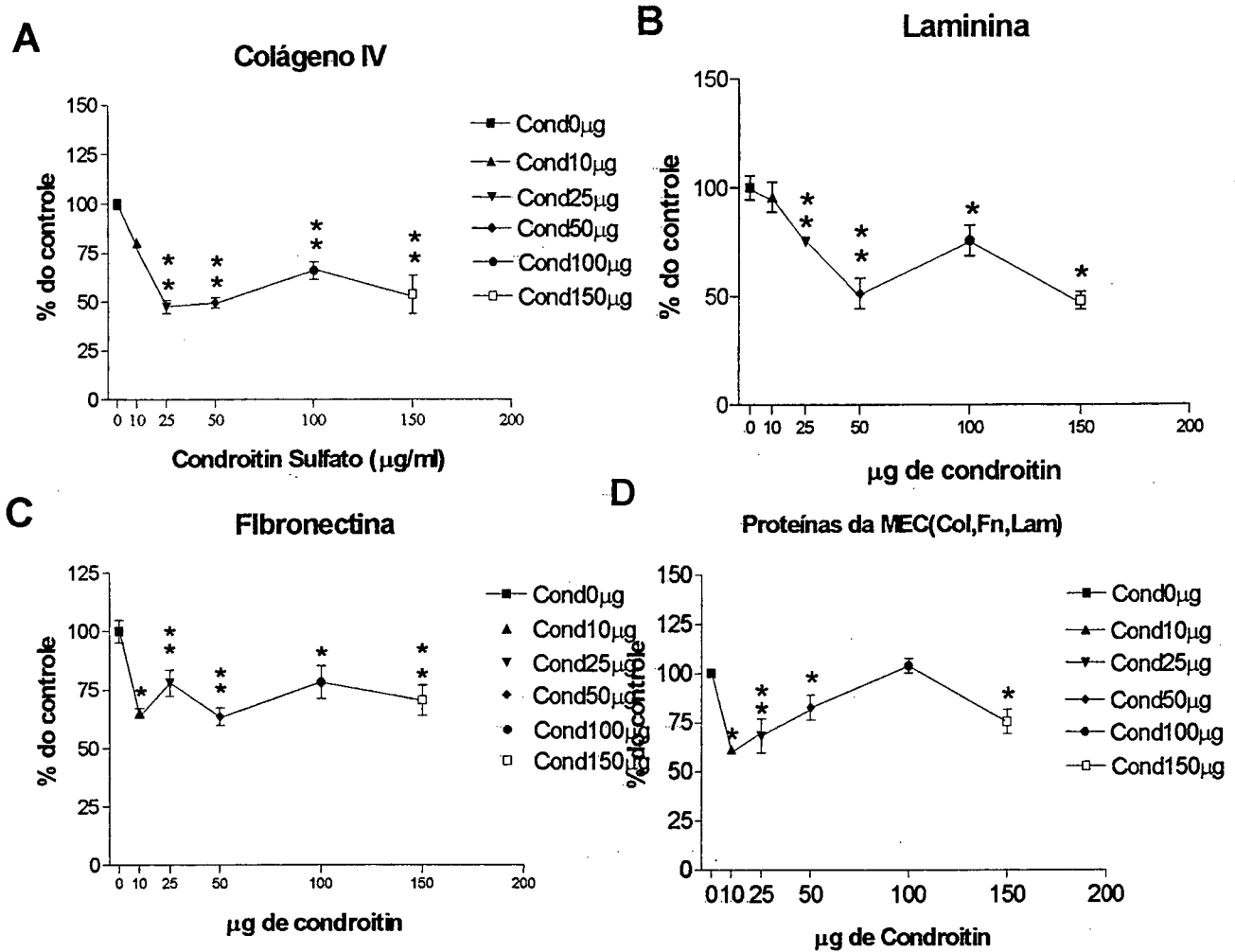


Figura 4: Efeito de Condroitin Sulfato na Adesão de C6 sobre Proteínas da MEC. Foram realizados ensaios de adesão celular em placas de ELISA com incubação previa por 12 horas de colágeno IV (col), laminina (Lam) e fibronectina (Fn), nas concentrações indicadas no gráfico. Utilizamos como concentração padrão 0,5 mg/poço. O ensaio foi realizado como descrito nos Materiais e Métodos. O condroitin sulfato foi acrescentado no momento do plaqueamento das células. Os resultados foram obtidos em absorbância a 540nm sendo expressos em porcentagem do controle (ausência de condroitin sulfato) e representam a média de três experimentos feitos em triplicata. Os gráficos A, B, C e D, representam, respectivamente, os efeitos de condroitin sulfato na adesão de C6 em Colágeno IV, Laminina, Fibronectinae sobre as três proteínas semeadas conjuntamente. Como teste estatístico utilizado foi o ANOVA com intervalo de confiança de 95%, e posteriormente o teste de Dunnett de comparação de grupos com o controle. A barra vertical corresponde ao erro padrão. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

Como o efeito da heparina sobre a adesão de C6 é específico para cada proteína da MEC, isso pode sugerir uma ação regulatória. Para verificar as interações entre heparina e as proteínas da MEC, modificamos o protocolo experimental. Desse modo, pré-incubamos a heparina com as proteínas de MEC por 12 horas, para então procedermos ao plaqueamento das células (Fig. 5). Os resultados obtidos neste ensaio, à exceção do experimento com o colágeno tipo IV, foram similares aos ensaios em que as células e heparina eram incubadas ao mesmo tempo. Após a pré-incubação de heparina com colágeno tipo IV, observamos redução significativa na adesão de C6 nas concentrações de 10 (79,8 \pm 7,78 %), 50 (68,83 \pm 4,87 %), 100 (68,4 \pm 4,06 %) e 150 μ g/poço (80,1 \pm 7,13 %) (Fig. 5 A). Este resultado sugere que a heparina, ao ser pré-incubada com colágeno tipo IV, possa estar bloqueando os sítios de interação do colágeno tipo IV com a célula. O experimento anterior (Fig. 4 A) pode sugerir que a heparina, quando incubada junto com a célula, atue de modo regulatório, interagindo tanto com os receptores celulares, como as integrinas, quanto com o colágeno tipo IV para promover a adesão celular.

Do mesmo modo, a pré-incubação da heparina com laminina reduz a adesão do glioma de modo dose dependente. Observamos inibição significativa nas concentrações de 10 (86 \pm 9,72 %), 50 (79,55 \pm 7,82 %), 100 (66,2 \pm 1,81 %) e 150 μ g/poço (71,17 \pm 10,14 %) (Fig. 5 B). Esse efeito foi similar ao observado quando incubamos a heparina junto com a célula.

Entretanto, a heparina pré-incubada com a fibronectina, bem como com as três proteínas da MEC juntas, não alterou a adesão de C6 sendo os resultados não significativos em nenhuma das concentrações testadas (Fig. 5 C e D, respectivamente). Esse resultado sugere que heparina, nas concentrações utilizadas, possa estar atuando de modo regulatório e específico para cada uma das proteínas da MEC testadas em promover a adesão do glioma C6.

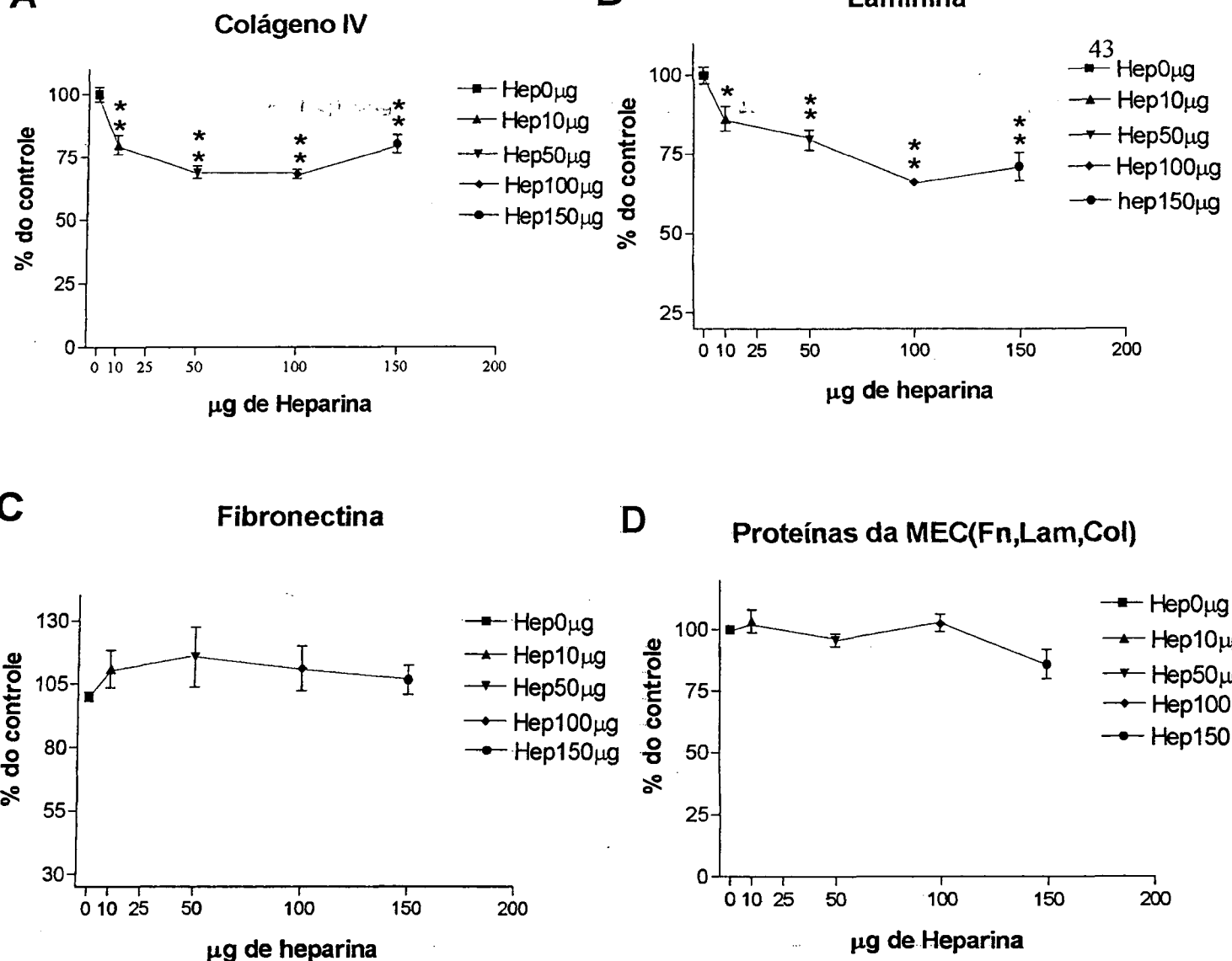


Figura 5: Efeito de Heparina Pré- Incubada com as Proteínas da Mec na Adesão de C6. Foram realizados ensaios de adesão celular em placas de ELISA com incubação previa por 12 horas de colágeno IV (col), laminina (Lam) e fibronectina (Fn), nas concentrações indicadas no gráfico, juntamente com a heparina. Utilizamos como concentração padrão 0,5 µg/poço. O ensaio foi realizado como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados foram obtidos em absorbância a 540nm sendo expressos em porcentagem do controle (ausência de heparina) e representam a média de três experimentos feitos em triplicata. Os gráficos A, B, C e D, representam, respectivamente, os efeitos de heparina pré-incubada com Laminina, Fibronectina, Colágeno IV e as três proteínas juntas na adesão de C6. Como teste estatístico utilizado foi o ANOVA com intervalo de confiança de 95%, e posteriormente o teste de Dunnett de comparação de grupos com o controle. A barra vertical corresponde ao erro padrão. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

Com o objetivo de analisar a interação da heparina com a superfície celular, realizamos um terceiro protocolo experimental, onde o GAG foi previamente incubado com as células já tripsinizadas, para, a seguir, se proceder à adesão sobre as proteínas da MEC (Fig. 6). Observamos que a heparina pré-incubada com a célula reduziu, de modo dose

dependente, a adesão celular a todas as três proteínas da MEC quando testadas isoladamente (Fig. 6 A, B e C), porém sem efeito significativo quando as mesmas foram testadas em conjunto (Fig. 6 D). Estes resultados podem sugerir que a heparina quando pré-incubada com a célula pode bloquear os sítios de interação com a MEC, dificultando a adesão.

Na incubação com Colágeno tipo IV, a redução da adesão foi significativa nas doses de heparina de 10 (72,73 % \pm 6,26 %), 50 (68,35 % \pm 9,55%), 100 (69,16% \pm 6,57 %) e 150 μ g/poço (49,7 % \pm 22,26 %) (Fig. 6 A), com fibronectina, nas concentrações de 50 (84,9 % \pm 2,88 %) 100 (76,21% \pm 8,57%) e 150 μ g/poço (60,85% \pm 14,97%) (Fig. 6 B) e com laminina, nas de 50 (85,99 % \pm 14,85 %) e 150 μ g/poço (67,17% \pm 17,33 %) (Fig. 6 C).

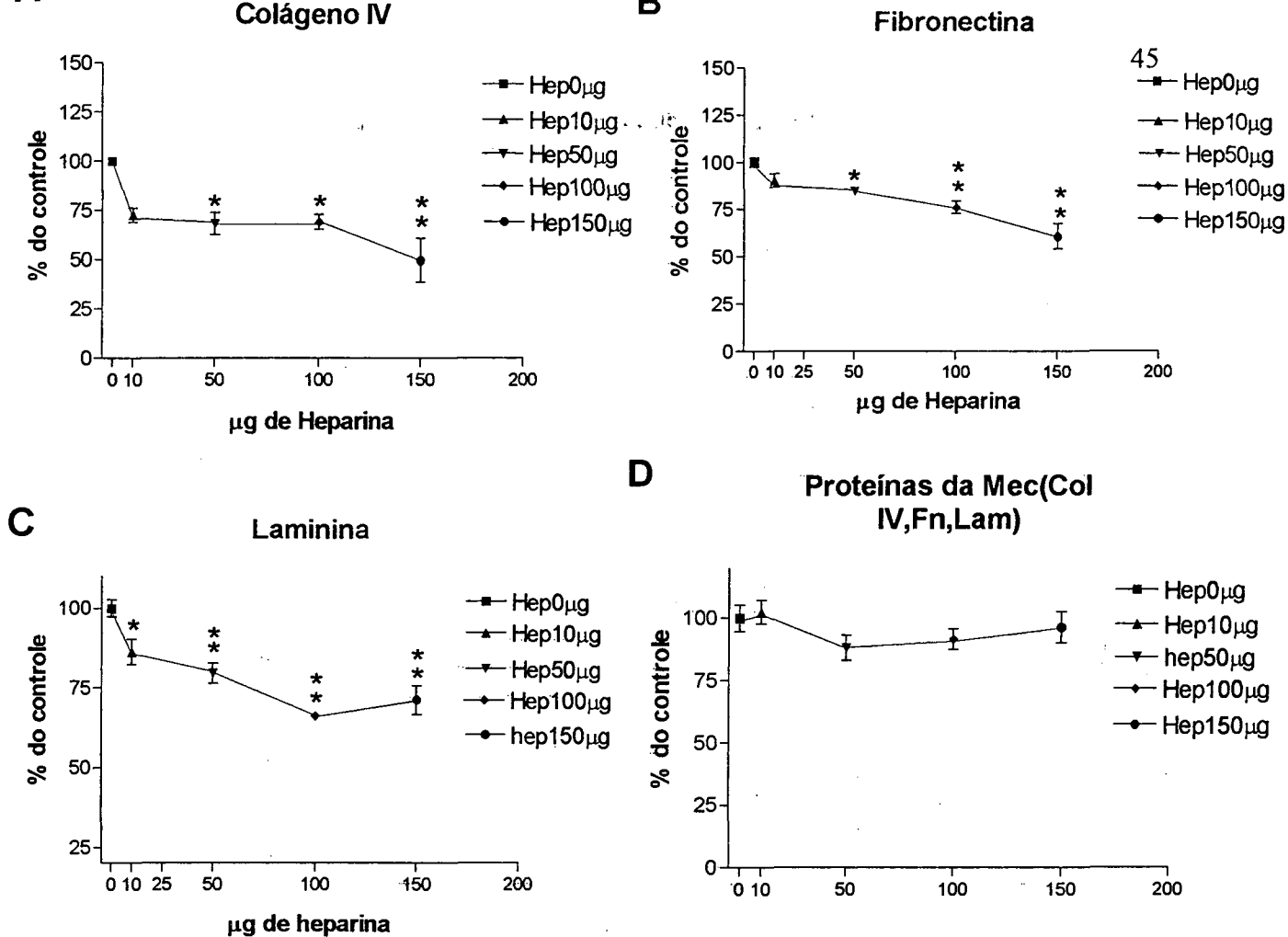


Figura 6: Efeito de Heparina Pré-Incubada com a Célula na Adesão de C6 sobre Proteínas da MEC. Foram realizados ensaios de adesão celular em placas de ELISA com incubação previa por 12 horas de colágeno IV (col), laminina (Lam) e fibronectina (Fn), nas concentrações indicadas no gráfico. Utilizamos como concentração padrão 0,5 µg/poço. As células C6 foram pré-incubadas com a heparina, durante 1h a 37 °C em PBS-glicose. O ensaio foi realizado como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados foram obtidos em absorbância a 540nm sendo expressos em porcentagem do controle (ausência de heparina) e representam a média de três experimentos feitos em triplicata. Os gráficos A, B, C e D, representam, respectivamente, os efeitos de heparina pré-incubada com Colágeno IV, Fibronectina, Laminina e as três proteínas juntas na adesão de C6. Como teste estatístico utilizado foi o ANOVA com intervalo de confiança de 95%, e posteriormente o teste de Dunnett de comparação de grupos com o controle. A barra vertical corresponde ao erro padrão. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

Em conjunto, estes resultados sugerem um importante papel da matriz extracelular (MEC) sobre adesão do glioma C6, *in vitro*. A MEC parece exercer uma função regulatória nesse processo. As proteínas laminina, fibronectina e colágeno tipo IV estimulam a adesão

e C6 de modo dose dependente, com ótima concentração em 0,5 µg/poço (placa de 96 poços). A combinação dessas proteínas sugere que exista uma interação e organização entre elas com grande controle de concentração. Parece que a rede formada pela mistura dos componentes de MEC exerce uma atividade biológica diferenciada, quando comparamos moléculas de MEC isoladas. Condroitin-sulfato reduz a adesão de C6, de modo dose dependente, a todas as proteínas da MEC testadas isoladas ou em conjunto, sugerindo um possível bloqueio dos sítios de interação da MEC com a superfície celular. Heparina, ao contrário, parece apresentar um papel regulatório na adesão de C6 sobre a MEC e específico para cada uma das proteínas testadas, estimulando a adesão (em colágeno tipo IV), inibindo (em laminina) ou sem alterações significativas (sobre fibronectina e as três moléculas em conjunto) a interação da célula ao substrato. Os experimentos de pré-incubação da heparina com a MEC ou com a célula parecem sugerir, que o efeito observado se deva a uma interação maior da heparina com as proteínas da MEC. O resultados sugerem ainda que a ação da heparina sobre a adesão de C6 em colágeno tipo IV possua um controle específico e mais direcionado para estruturas moleculares complementares a heparina.

B) Ensaios *in vivo*

Resultados anteriores do laboratório haviam demonstrado que o tratamento *in vitro* de células C6 com a droga: clorato de sódio, que inibe a sulfatação dos glicosaminoglicanos modificando a carga de PGs (Alvarez-Silva & Trentin, 1996), reduz a adesão celular a laminina, fibronectina e colágeno IV, assim como inibe significativamente a proliferação destas células (Mendes de Aguiar et al. 1999 e 2000), sugerindo uma importante participação da sulfatação dos GAGs, sobre a adesão assim como na proliferação celular. Baseado nos resultados dos ensaios *in vitro*, decidimos analisar o papel da matriz extracelular (MEC), especialmente dos glicosaminoglicanos, sobre a implantação e crescimento *in vivo* do glioma C6. Analisamos inicialmente a implantação subcutânea do tumor e a seguir a intracerebral.

2.3. Inoculação Subcutânea de C6 em ratos Wistar:

Para padronização do estudo de implantação de tumor subcutâneo fizemos um teste toxicológico para a dose de Clorato de Sódio a ser utilizada e verificamos, após um tratamento similar ao do grupo experimental e seriado (4 dias de inoculação de Clorato subcutâneo), que a análise anatomo-patológica não revelou alterações visíveis nos órgãos (fígado, rins, pulmão e baço) ou tecidos, assim como os animais não apresentaram qualquer sintomatologia clínica compatível com intoxicação aguda ou crônica.

Buscamos uma concentração sérica após a absorção de 50 mM, de modo que o clorato em diluição foi injetado levando-se em consideração o volume sanguíneo aproximado de cada animal em função do peso. Foi injetado em cada animal por volta de 1ml por dia a uma concentração de 0,6 M. A análise anatomo-patológica após 30 dias revelou os seguintes resultados:

Grupo 1- Controle (n=10): Todos os animais inoculados via SC no flanco com 2×10^7 células desenvolveram tumores visíveis a macroscopia, com diâmetros médios de $2,7 \pm 1,0$ cm.

Grupo 2- Tratamento (n=8): Nenhum dos animais inoculados com 2×10^7 células submetidos a tratamento com Clorato de Sódio a 200 mM SID por 04 dias apresentou massa tumoral visível a macroscopia quando submetidos a necropsia após 30 dias. Estes resultados são mostrados na figura 6.

Obs: Todos os animais observados não apresentaram alterações patológicas visíveis à macroscopia nos demais órgãos e tecidos.

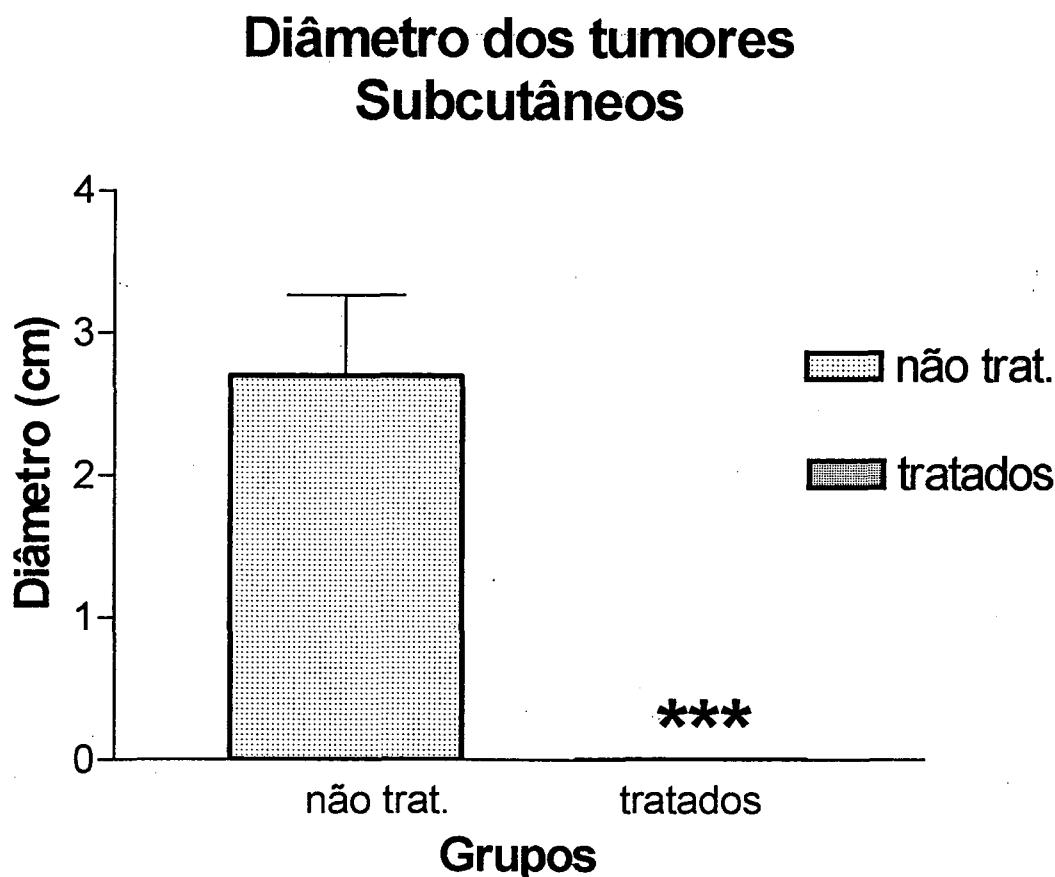


Figura 7) Diâmetro da Massa Tumoral Injetada Subcutânea nos Grupos não tratado e tratado com Clorato Após Trinta Dias de Inoculação.

Nestes Grupos foram inoculadas 2×10^7 células em cada sujeito na região do flanco esquerdo, próximo à articulação fêmuro-tíbio-patelar e os animais foram mantidos em caixas até o dia da necrópsia. Excluindo-se as massas tumorais, não foi observado à macroscopia na necrópsia qualquer outra alteração nos demais órgãos digna de nota. Para a análise estatística foi utilizado o teste T de Student, verificando-se uma alteração significativa em que P foi menor que 0,001, denotada por três asteriscos (***), sendo o erro-padrão expresso sob a forma de barra vertical. O número de animais usados foi de 7 e 8 nos grupos tratados e não tratados respectivamente.

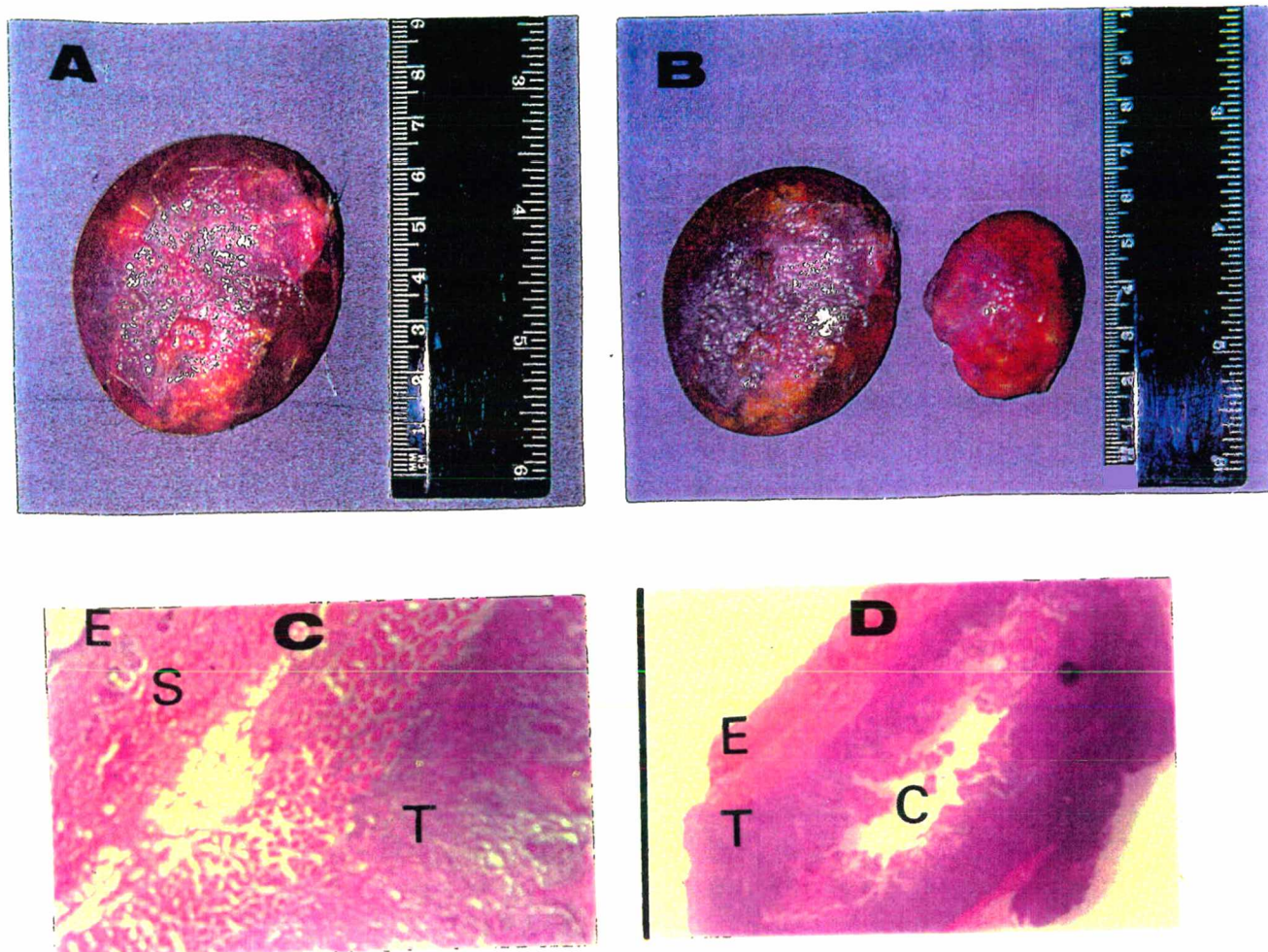


Figura 8: : Aspecto da Massas tumorais subcutâneas retiradas dos animais

inoculados por via SC aos 30 dias. **A** = aspecto de massa de glioma C6 típica tumoral subcutânea encapsulada contendo exsudato seroso . **B** = aspecto de massas tumorais do glioma C6 subcutâneo sem tratamento aos 30 dias, evidenciando a variabilidade de volume. **C** = aspecto histopatológico da massa tumoral subcutânea, onde são visualizados o epitélio (E), o tecido subcutâneo (S) e a massa tumoral (T). Aumento de 40X, corante HE. **D** = aspecto histopatológico da massa tumoral subcutânea, evidenciando o tecido epitelial (E), a massa tumoral (T) e a cavidade interna da cápsula (C), a qual estava à necrópsia repleta de exsudato seroso. Aumento de 5X , corante HE.

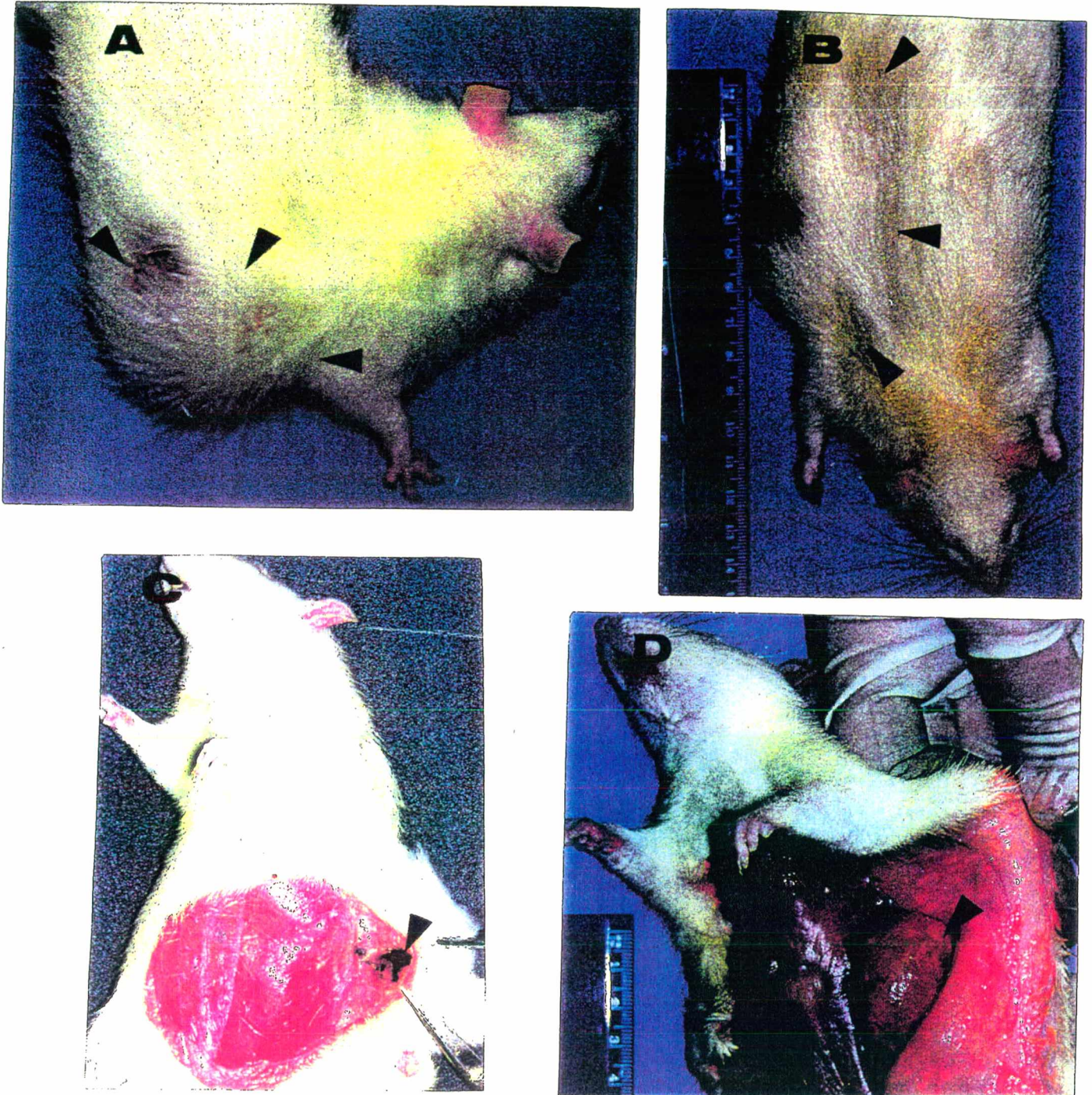


Figura 9: Aspecto dos Animais inoculados com tumor subcutâneo aos 30 dias . A e B = animais sem tratamento, em que se nota no flanco esquerdo uma grande massa tumoral subcutânea (seta); C= aspecto à necrópsia (30 dias de inoculação) da região subcutânea correspondente à inoculação em animais tratados com clorato, em que se nota uma pequena área de cicatricial com necrose (seta) e D = aspecto à necrópsia (30 dias de inoculação) de animais não tratados, em que se nota grande massa tumoral do glioma (seta)

2.4. Inoculação Intracerebral de C6 em ratos Wistar.

2.4.1. Experimentos de sobrevivência

Diante dos resultados do tratamento com clorato de sódio sobre o crescimento do glioma inoculado de modo subcutâneo, resolvemos investigar o efeito do droga sobre o tumor inoculado na via intracerebral. O grupo controle correspondeu a animais inoculados com células C6 (em meio de cultura) sem tratamento prévio com clorato de sódio. Após 60 dias, 13 animais (de um total de 15 inoculados) desenvolveram o tumor (tabela 1). Se considerarmos a média de todo o grupo inoculado (15 animais), nos 60 dias do experimento, temos então $36,1 \pm 12,55$ dias (fig.10A).

No grupo de animais inoculados com células C6 pré-tratadas com clorato de sódio em meio de cultura sem clorato, 6 de 9 animais desenvolveram o tumor (tabela 1), sendo a sobrevivência de $35,75 \pm 3,77$ (Fig. 8), enquanto que a sobrevivência média do grupo inteiro, no decorrer de 60 dias, foi de $46,50 \pm 11,43$ dias, sendo significativamente maior do que o primeiro grupo (Fig. 10 A).

Já no grupo inoculado com células C6 pré-tratadas com clorato de sódio em meio de cultura contendo a droga, verificamos os maiores índices de animais que não desenvolveram o tumor. Dos 15 animais inoculados, apenas 4 desenvolveram o tumor (tabela 1). A sobrevivência desses animais foi de $38,40 \pm 3,130$ dias . A sobrevivência geral do grupo, aos 60 dias foi de $53,53 \pm 11,24$ dias (Fig.10 A). Desse modo, observamos redução no número de animais que desenvolveram o tumor e aumento da sua sobrevida. Esse resultado pode sugerir que o pré-tratamento da células C6 com o clorato de sódio e inoculação em meio de cultura contendo a droga, é capaz de reduzir a implantação do glioma no cérebro.

Uma vez que os animais inoculados com células C6 pré-tratadas com clorato de sódio apresentaram sobrevida maior do que o controle, resolvemos analisar se o tratamento posterior com a droga também é capaz de reduzir o tamanho do tumor já implantado. Analisamos, inicialmente, a sobrevivência dos animais tratados com clorato de sódio posteriormente à

implantação do tumor. Nesses de animais foram introduzidas cânulas por onde as células foram inoculadas e posteriormente (um dia após) o veículo ou a droga (4ul de Clorato a 0,1M), nos 5 dias subseqüentes (grupo canulado) (Fig. 10 C).

TABELA 1. Inoculação Intracerebral do Glioma C6.

Grupos Experimentais	Animais Totais	Animais com Tumor	Animais sem Tumor
Animais inoculados com céls. C6 tratamento prévio	15	12 (80%)	3 (20%)
Animais inoculados com céls. C6 tratadas com clorato de sódio, em mei cultura	9	6 (66,67%)	3 (33,33%)
Animais inoculados com céls C6 tratadas com clorato de sódio, em mei cultura contendo clorato de sódio	15	4 (26,66%)	11(73,34%) **
Animais sensibilizados i.p. com C6	9	3 (33,33%)	6 (66,66%) *
Animais sensibilizados i.p. com céls pré-tratadas com clorato de sódio	11	4 (36,36%)	7(66,64%) *
Animais tratados via cânula com salina	8	7(87,5%)	1(12,5%)
Animais tratados via cânula com clorat sódio 0,1M	8	5(62,5%)	3 (37,5%)

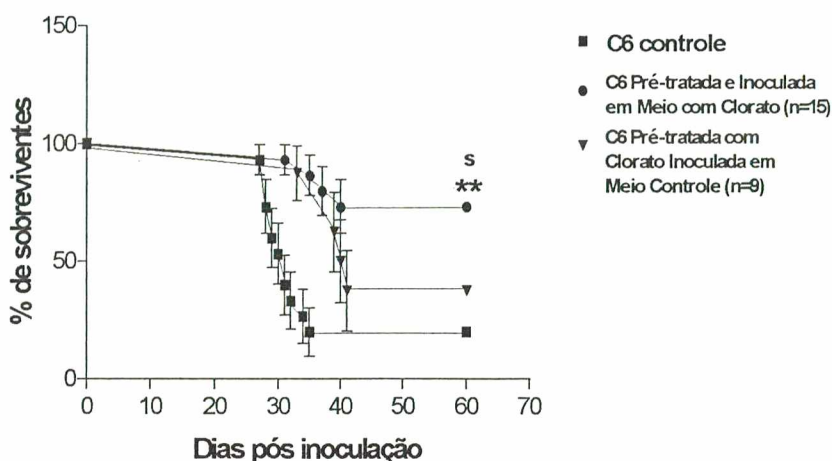
Os animais foram observados durante 60 dias, que foi o máximo admitido para os animais que não desenvolveram tumor, sendo que este valor corresponde a aproximadamente o dobro da média de sobrevida observada nos animais com tumor. Foi utilizado para comparação entre grupos e o controle inoculado com C6 sem tratamento (primeiro da tabela) o teste de qui-quadrado, tendo sido sendo feita a notação (*) para $p < 0,05$; e (**) para $p < 0,01$.

No grupo dos animais canulados, que receberam apenas o veículo (controle), 7 dos 8 animais inoculados desenvolveram o tumor (tabela 1) com uma sobrevivência de $26,33 \pm 13,54$ dias (Fig. 10 C). Por outro lado o grupo de animais canulados e tratados com clorato de sódio apresentou 5 animais com tumor, dos 8 inoculados (tabela 1) e uma sobrevivência média de

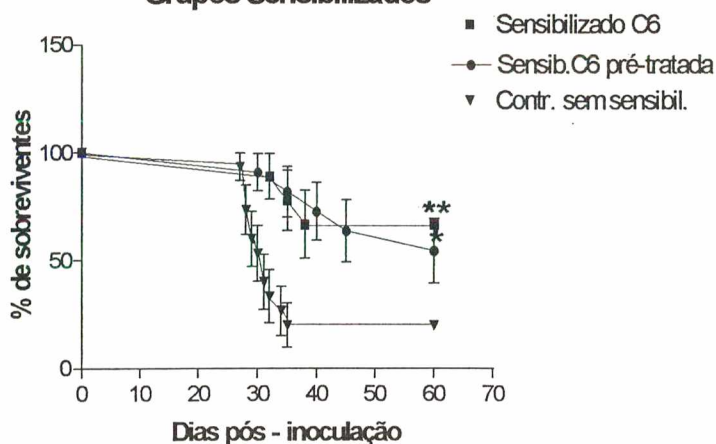
43,00 \pm 14,51 dias, nos 60 dias de experimento, sendo significativo em relação ao grupo controle . (Fig. 10 C). Esses resultados sugerem que o tratamento com clorato de sódio é eficaz em aumentar a sobrevivência dos animais quando em contato prolongado com a célula pré-tratada por 48 horas até o momento da inoculação, como também consegue prolongar a sobrevivência dos animais tratados após a inoculação, quando aplicado no sítio do tumor (canulados) , sendo que neste último protocolo observamos uma mortalidade mais elevada em relação ao tratamento anterior (de 48 horas em cultura no meio com clorato até a inoculação).

A seguir procedemos à sensibilização intraperitoneal (i.p.) de um grupo de animais com células C6 ($0,5 \times 10^5$) anteriormente à inoculação intracerebral do glioma. Esse experimento permite avaliar uma possível modificação no padrão da resposta imunológica promovida pela inoculação das células C6 pré-tratadas com clorato de sódio. Verificamos então que, no grupo sensibilizado com células C6 controle (sem tratamento prévio), 3 dos 9 animais que apresentaram indícios de desenvolvimento do tumor, morreram antes dos 60 dias do experimento (tabela 1). A média de sobrevivência do grupo, no decorrer desse período, foi de 51,67 \pm 12,59 dias. A sobrevivência média dos três animais com tumor foi de 35 \pm 3 dias. A curva de sobrevivência quando comparada à do grupo controle, sem sensibilização prévia, foi significativamente maior (fig. 10, B). Observamos no grupo de animais sensibilizado com células C6 pré-tratadas com clorato de sódio, que 4 animais, de um total de 15, desenvolveram o tumor. A sobrevivência média do grupo nos 60 dias do experimento foi de 58,23 \pm 6,38 dias, não sendo significativamente diferente do grupo sensibilizado com células C6 controle. A sobrevivência deste grupo, no entanto, foi significativamente maior em relação ao controle sem sensibilização ($p < 0,01$) (Fig. 10 B).

A Pré-Tratamento com Clorato



B Grupos Sensibilizados



C Grupo Canulado (Clorato pós inoculação)

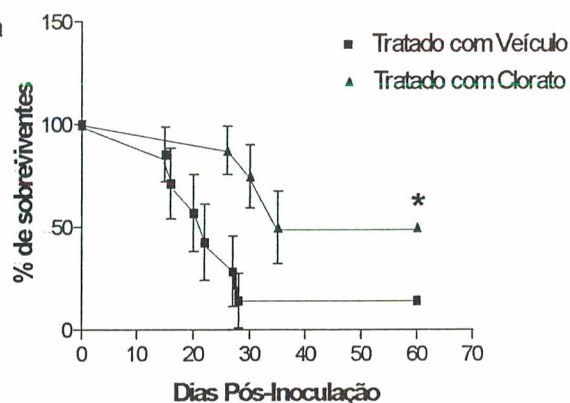
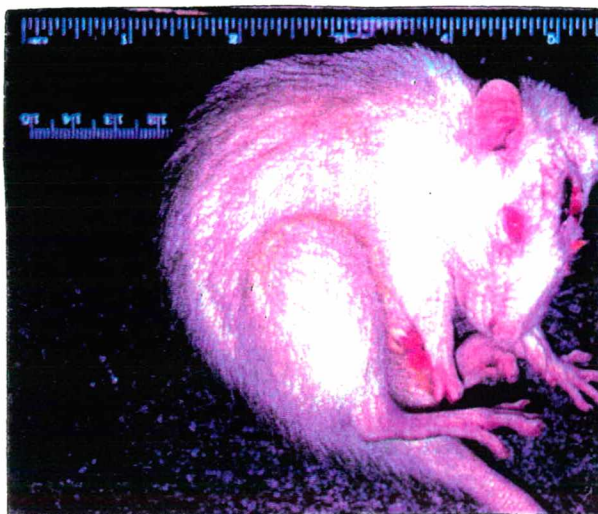


Figura 10) Curvas de Sobrevivência dos Animais Inoculados Intracerebralmente com Glioma C6 e submetidos a Diversos Tratamentos com Clorato. Neste experimento foi avaliada a capacidade de sobrevivência em dias pós-inoculação intracerebral do tumor, em grupos em que as células C6 foram pré-tratadas por 48 horas em meio com Clorato 50 mM e inoculadas ou nesse meio ou em meio sem Clorato (A); em grupos pré-sensibilizados via IP antes da inoculação, com células pré-tratadas ou não com meio com Clorato (B); e em grupos em que foi introduzida uma cânula em que após uma semana as células foram inoculadas e nos cinco dias subsequentes receberam um tratamento com 5 μ l de veículo -PBS ou Clorato 0,1M em PBS (C). Foi procedido para a análise estatística o ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls. Os resultados são expressos em porcentagem dos animais sobreviventes, as barras verticais são o erros -padrão da média. Para cada resultado significativo foi indicado um caractere, sendo um asterisco (*) para $P < 0,05$, dois asteriscos (**) para $P < 0,01$ e três (***) para $P < 0,001$ com relação ao grupo controle inoculado com C6 sem qualquer tratamento. Para expressar a significância entre os grupos tratados foi utilizado um s para $P < 0,05$. Para estes testes foi usado um numero de

A



B



C

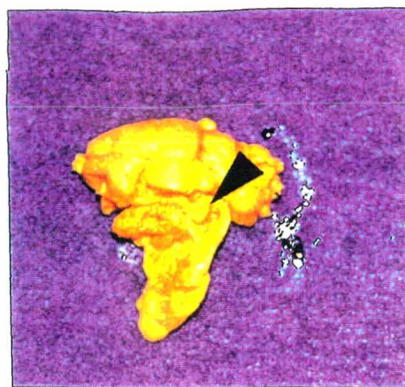


Figura 11- Tumores cerebrais à Macroscopia . A = Aspecto do Animal Acometido pelo tumor intracerebral aos 29 dias de inoculação. Este animal apresentava sintomas como paresia e incoordenação motora; B = aspecto em detalhe de sua massa tumoral (seta) no encéfalo durante a necrópsia. Notar a coloração mais escura da massa tumoral em contraste com o hemisfério. C= aspecto de um cérebro com massa tumoral (seta) conservado em Bouin.

4.4. Análises Histopatológicas

Para uma melhor análise do efeito do clorato de sódio sobre o crescimento do glioma C6 *in vivo*, realizamos análises histopatológicas dos cérebros dos animais dos diferentes grupos experimentais. Verificamos que o grupo de animais controle inoculados intracerebralmente com células C6 sem qualquer pré-tratamento apresentaram uma área tumoral média de $217,50 \pm 189,86 \mu\text{m}^2$ após 10 dias de inoculação.

O grupo de animais em que as células C6 foram pré-tratadas com clorato de sódio e inoculadas em meio sem a droga apresentou a área tumoral média foi de $245,510 \pm 135,40 \mu\text{m}^2$. Este resultado não foi significativamente diferente do grupo controle acima.

Já o grupo experimental inoculado com células C6 pré-tratadas com clorato de sódio e inoculadas em meio com a droga, apresentou área tumoral média de $16,55 \pm 31,52 \mu\text{m}^2$, o que representou uma diferença significativa em relação aos dois grupos acima (incluindo o controle sem pré-tratamento). (Fig. 12 A).

Os grupos de animais pré-sensibilizados intraperitonealmente com células C6 apresentaram uma marcada redução na área tumoral após 10 dias de inoculação intracerebral de células C6. O grupo sensibilizado com células C6 controle apresentou área média de $77,69 \pm 79,78 \mu\text{m}^2$, enquanto que o grupo sensibilizado com C6 pré-tratada com clorato de sódio revelou uma área média de $51,56 \pm 45,51 \mu\text{m}^2$. Assim como nos resultados de sobrevivência, não houve diferença significativa entre esses dois grupos experimentais (Fig. 12B).

O grupo de animais canulados, inoculados com células C6 mais veículo nos cinco dias subseqüentes, apresentou a área tumoral media de $208,45 \pm 226,40 \mu\text{m}^2$, enquanto que o grupo canulado inoculado com células C6 e tratado com 4 ul de clorato de sódio a 0,1M nos cinco dias subseqüentes, revelou uma área tumoral média de $234,08 \pm 223,61 \mu\text{m}^2$. Contrariamente aos resultados obtidos com os testes de sobrevivência, não observamos diferenças significativas entre estes dois grupos (Fig. 12C).

Analisamos a seguir, as áreas totais dos cortes coronais examinados em todos os grupos experimentais e constatamos que não houve diferença significativa entre os grupos inoculados. A média geral das áreas dos cortes foi de $0,965 \pm 0,042 \text{ cm}^2$.

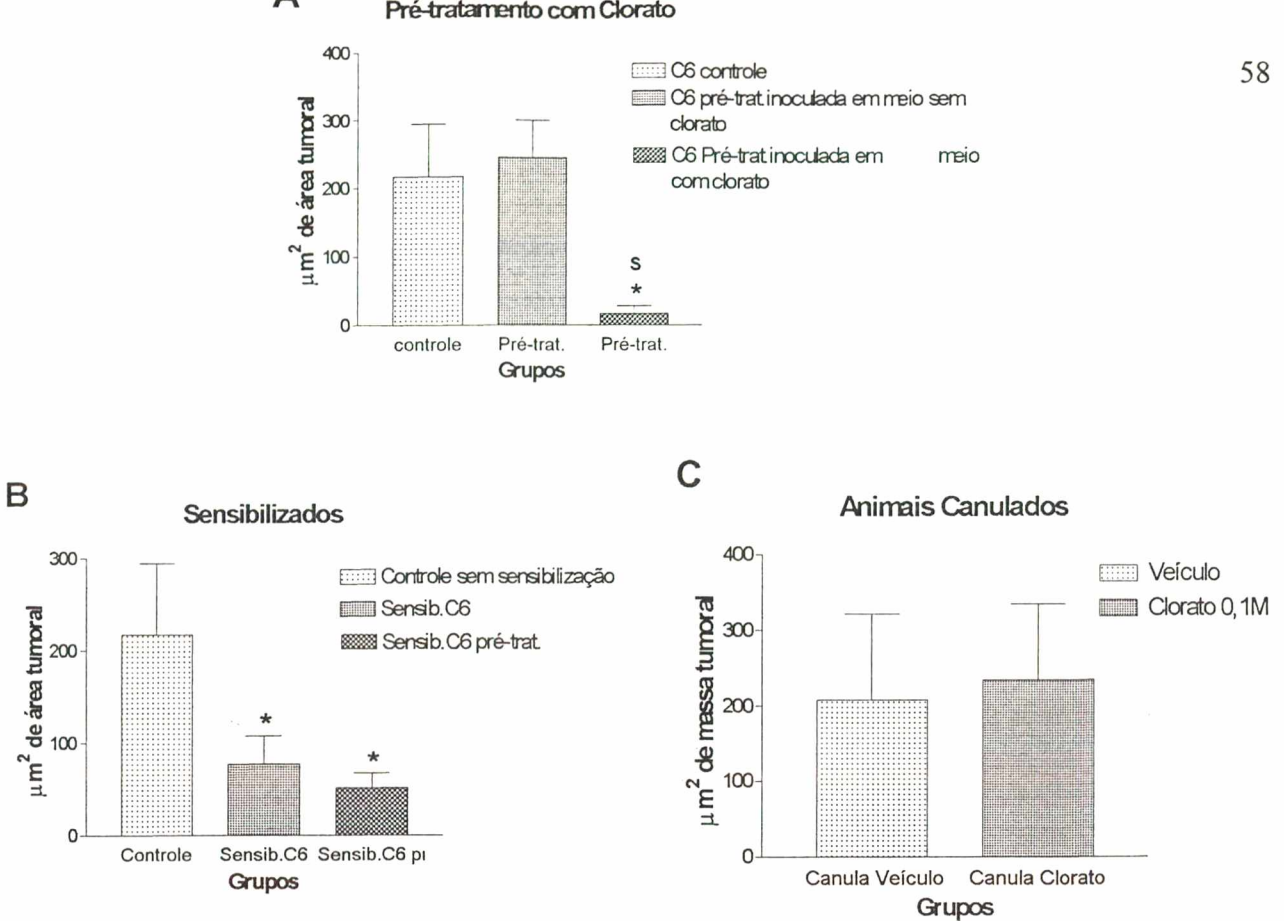


Figura 12: Análise Histopatológica de Efeitos de diferentes tratamentos com Clorato de Sódio no glioma C6 na área ocupada pelo tumor no parênquima cerebral aos Dez dias de Inoculação. Os animais foram sacrificados aos 10 dias de inoculação intracerebral de 1×10^5 células C6 e seus cérebros fixados em Bodian. Foi feito um corte inicial em aparelho justamente na cicatriz de inoculação para que se tivesse um controle do ângulo de corte. Os cérebros foram postos em parafina e cortados em micrôtom a espessura de 5 μm seguindo o mesmo ângulo de corte já realizado. Daí foram feitas as lâminas coradas em HE. Para efetuar a medição da área tumoral foi usada uma ocular micrométrica a qual mediu as maiores distâncias nos eixos horizontal e vertical da área tumoral. O resultado obtido foi uma aproximação feita pela multiplicação dos dois valores obtidos. Comparamos nesta análise histopatológica vários protocolos de tratamento do glioma C6 envolvendo o Clorato de Sódio, a saber: A, o efeito do pré-tratamento de C6 por 24 horas, seguido ou não de permanência no meio com clorato até o momento da inoculação; B, o efeito de sensibilizações intraperitoneais com células C6 pré-tratadas ou não com Clorato em implantação posterior do glioma; C, o efeito da dose de 0,1 M de Clorato em 4 μl aplicado por 5 dias após a implantação do glioma C6, via cânulas anteriormente implantadas. A análise estatística foi realizada utilizando-se o ANOVA de uma via e posteriormente o teste de Newman-Keuls, que compara todos os grupos. Os resultados significativos em que $P < 0,05$ em relação ao controle foram indicados com um asterisco (*). Os grupos que receberam diferentes tratamentos dentro de um mesmo protocolo (cada gráfico é um protocolo) e que foram significativos receberam a denotação **s** para $P < 0,05$.

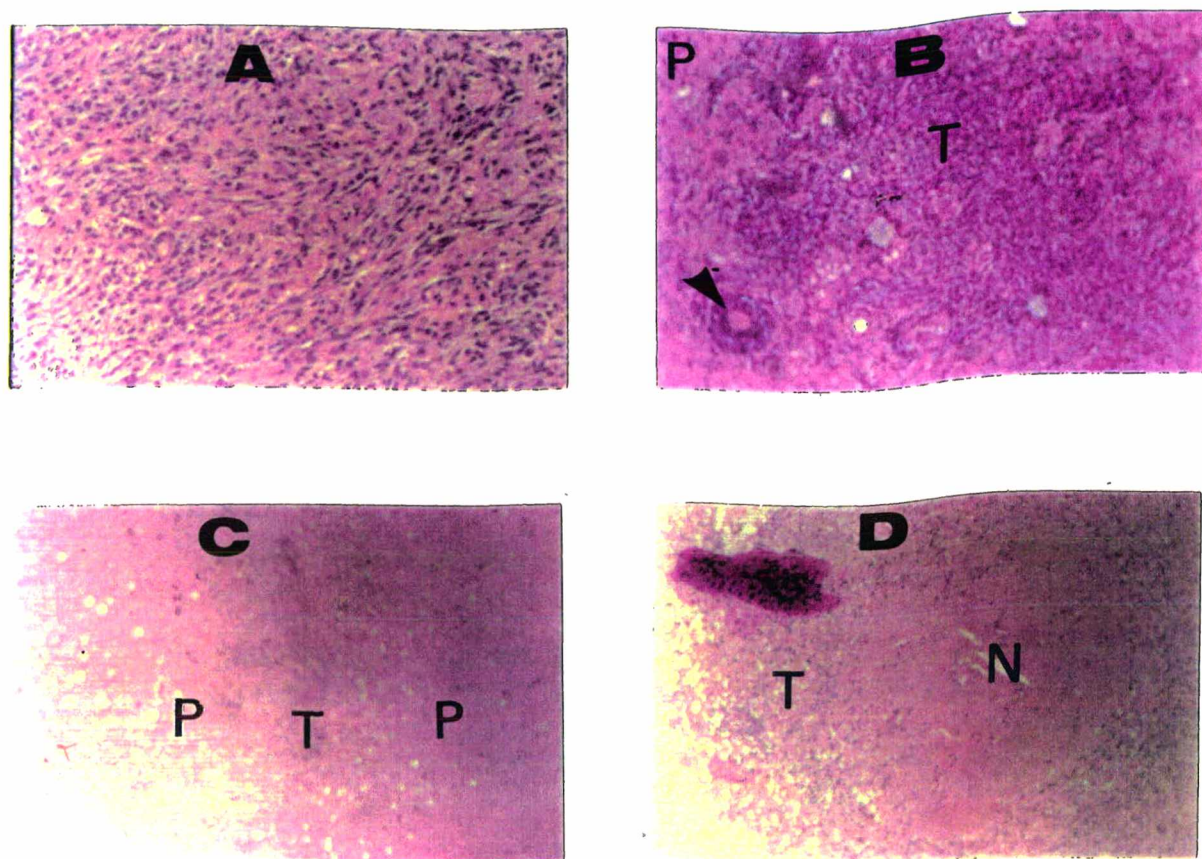


Figura 13—Cortes coronais de encéfalos de animais tratados e controle inoculados intracerebralmente com o glioma C6 ao aumento de 100X. A = massa tumoral no desenvolvimento inicial, com 7 dias de inoculação. **B =** aspecto infiltrativo da massa tumoral infiltrativo aos 10 dias de inoculação em animal não tratado, e a preferência das células tumorais pela região próxima dos vasos sanguíneos (seta). T representa a área de parênquima tumoral e P a área de parênquima cerebral. **C =** aspecto de massa tumoral aos 10 dias em animal que recebeu C6 pré-tratada com clorato em meio com clorato. A área ocupada pelo tumor (T), mais escura, ao centro neste animal é menor do que a correspondente em animal não tratado. P representa o parênquima cerebral. **D =** caso incomum de achado de área de necrose (N) intratumoral à idade de 10 dias de inoculação. T representa o parênquima tumoral contendo células viáveis. (No presente estudo houveram somente dois casos em mais de 60 lâminas).

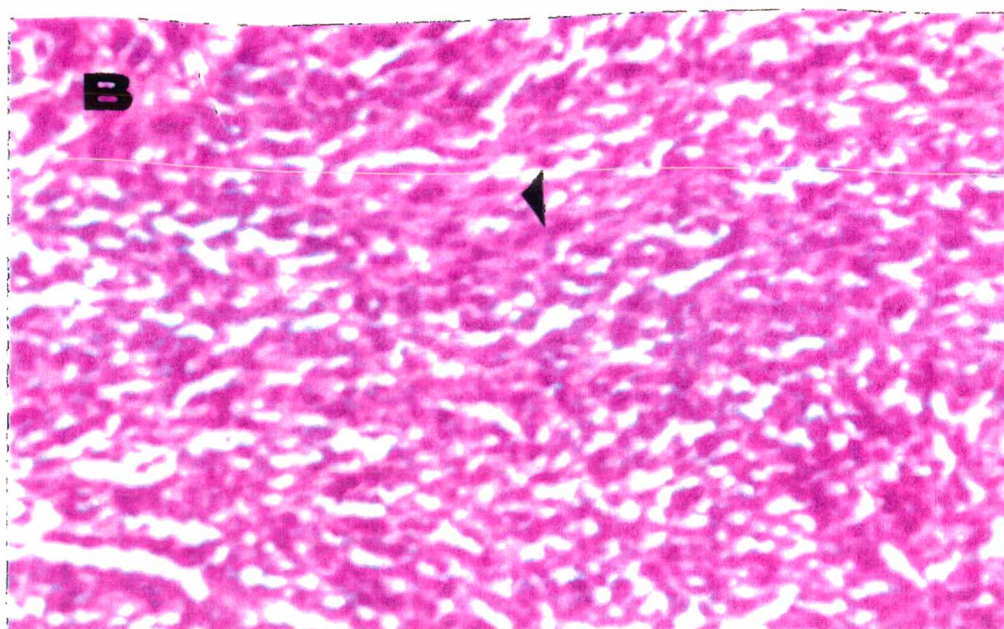
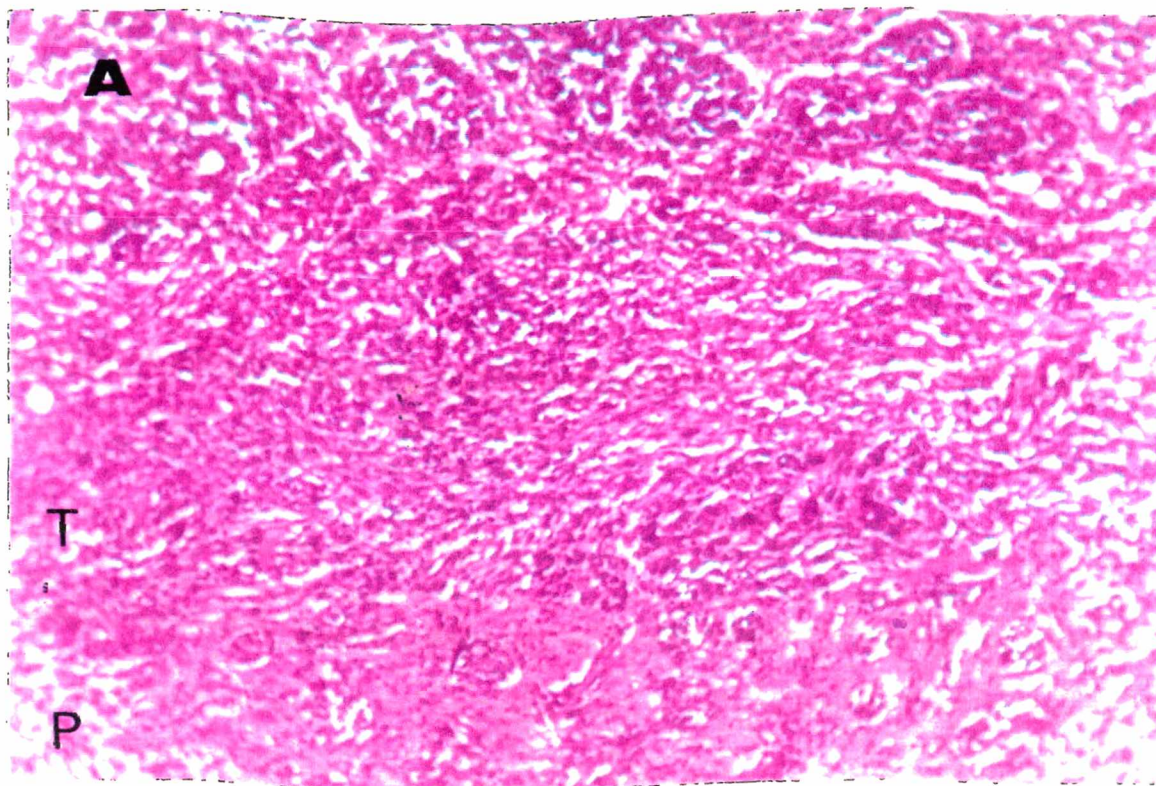


Figura 14: Aspecto histopatológico da área tumoral encontrada no parênquima cerebral de animal inoculado com células C6 sem pré-tratamento, corado em HE. A = aspecto da transição da área ocupada pelo tumor , com a notação T (corada em violeta, pela abundância de núcleos) para o parênquima (P) cerebral (corado em róseo). Aumento 100X. B = mesmo corte, em aumento de 200X, em que se notam células (seta) com o que parece ser o fuso mitótico. A proliferação celular é uma característica abundante na histopatologia de gliomas. Nota-se também o tamanho irregular das células, bem como sua diferenciada morfologia individual. Todos os cortes foram feitos à altura da sutura do bregma.

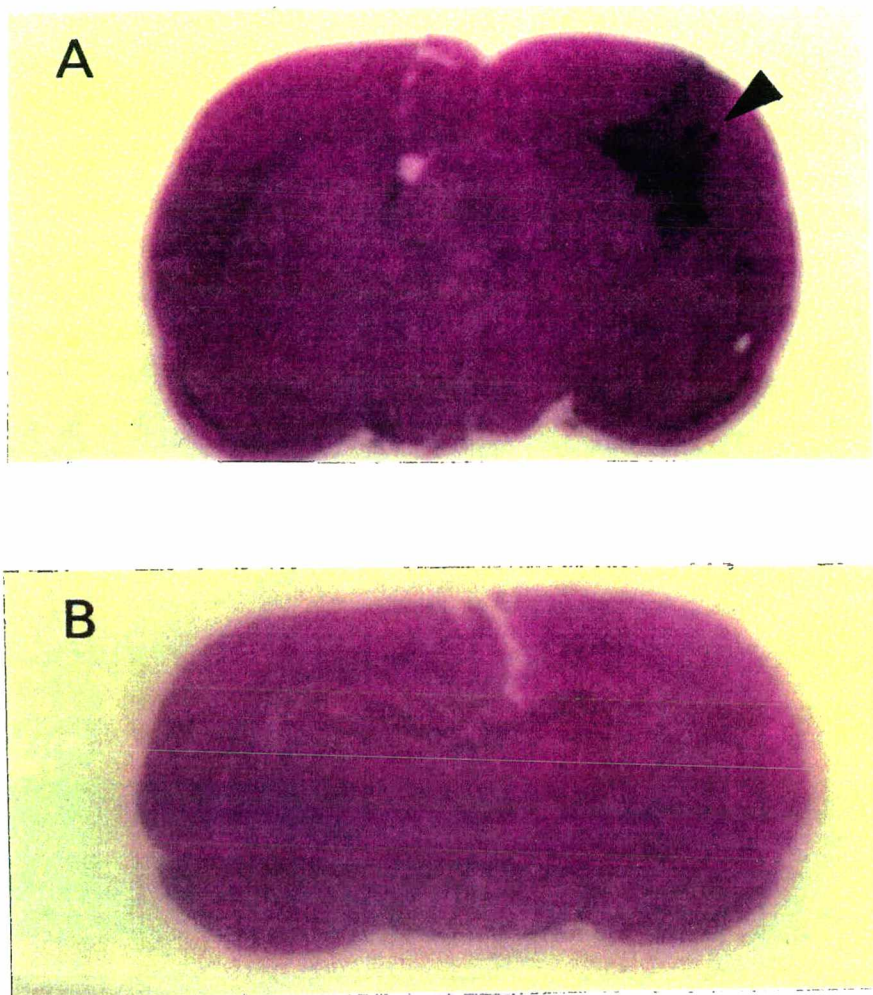


Figura 15. Aspecto de cortes coronais de encéfalos de animais na lupa de 7X. A = Cérebro de animal que recebeu C6 sem pré-tratamento. Notar aí a massa tumoral escura no hemisfério esquerdo (seta). B= cérebro de animal que recebeu C6 tratada com clorato inoculado em meio com clorato. Todos os cortes foram feitos à altura do bregma.

4.5. Hemogramas

Analizamos, a seguir os hemogramas realizados nos animais de alguns grupos experimentais utilizados para a análise da sobrevivência. Esses resultados revelaram uma variação notável nos glóbulos sangüíneos da série branca. Em relação à série vermelha, observamos uma variação bem menor, mantendo-se na faixa normal, considerando-se os parâmetros citados na literatura (ver tabela anexa).

Observamos variação da série sanguínea branca tanto na contagem global de leucócitos quanto na contagem global de linfócitos, o que, em rato, representa algo em torno de 70% da contagem leucocitária global (Lee GR et al, 1998). Logo, este último foi o parâmetro da série branca que foi mais significativamente o responsável pelas alterações globais observadas. Observamos, realizando hemogramas seriados aos 7, 14, 24 e 28 dias, uma leucopenia e linfopenia que começou a se fazer significativamente presente durante a quarta semana após a inoculação das células de glioma (aos 28 dias, próximo à média de sobrevivência do grupo controle), nos grupos de animais inoculados com C6 controle. A contagem de monócitos (5-12% dos leucócitos totais) aos 28 dias da cirurgia não apresentou diferença significativa entre os grupos de animais controle (sem tumor) e inoculados com C6 controle. O grupo controle-operado (sem tumor) obteve a média de leucócitos de $11,2 \pm 2,8$ ($\times 10^3$ céls/ μ l) aos 28 dias da cirurgia; o grupo inoculado com células C6 de $4,7250 \pm 0,38$ ($\times 10^3$ céls/ μ l) leucócitos, tendo aí diferença significativa.(fig.16). Em relação à contagem de linfócitos (aos 28 dias), o grupo controle-operado (sem tumor) obteve a média de $9,140 \pm 2,270$ ($\times 10^3$ céls/ μ l), o grupo inoculado com células C6 de $2,92 \pm 0,2$ ($\times 10^3$ céls/ μ l) , sendo esta diferença significativa. Quanto à contagem de monócitos (aos 28 dias), o grupo controle (sem tumor) obteve a média de $1,1750 \pm 0,330$ ($\times 10^3$ céls/ μ l), o grupo inoculado com células C6 controle de $0,83 \pm 0,33$ ($\times 10^3$ céls/ μ l) monócitos, e o grupo inoculado com C6 pré-tratado de $0,87 \pm 0,12$ ($\times 10^3$ céls/ μ l) monócitos totais.

Por outro lado, não observamos diferenças significativas na contagem dos glóbulos sangüíneos da série branca (leucócitos totais, linfócitos ou monócitos) entre os grupos de animais sensibilizados i.p. com C6 aos 28 dias da cirurgia de inoculação (tanto sensibilizados com C6 sem pré-tratamento como sensibilizados com C6 pré-tratada) e os animais controle-operados (sem tumor). Verificamos uma redução significativa na contagem de leucócitos globais e de linfócitos no grupo

inoculado com C6 controle aos 28 dias após a inoculação do tumor, em relação ao controle (sem tumor). No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos controle-operado (sem o tumor) e o inoculado com C6, no que se refere à contagem monocitária. (Fig. 16).

No grupo de animais sensibilizados com células C6 pré-tratadas com clorato de sódio, obtivemos a média de leucócitos totais de $10,95 \pm 2,30$ ($\times 10^3$ céls/ μ l) e a média de linfócitos de $9,46 \pm 1,82$ ($\times 10^3$ céls/ μ l). Já no grupo sensibilizado com células C6 controle, a média de leucócitos totais foi de $12,480 \pm 2,80$ ($\times 10^3$ céls/ μ l) e a média de linfócitos de $10,05 \pm 2,22$ ($\times 10^3$ céls/ μ l) (Fig. 16). As duas médias não foram significativas entre si, assim como não foram significativas em relação ao grupo controle-operado sem tumor (*sham*). As médias linfocitárias e leucocitárias dos animais sensibilizados só foram significativamente maiores em relação às médias dos animais inoculados com C6 aos 28 dias. Analisando a série sanguínea vermelha, nestes grupos de animais, verificamos que todos os grupos de animais, seja sensibilizados, inoculados ou controle, mantiveram-se dentro da faixa normal descrita pela literatura, e sua variação, por se ter conservado em uma estreita faixa e dentro destes parâmetros, não foi considerada (tabela 2 e tabela anexa).

Fizemos também hemogramas em outros animais sensibilizados (com C6 e C6 pré-tratada com clorato) uma semana (7 dias) após a segunda sensibilização e antes da cirurgia, e não foi detectada diferença significativa em qualquer parâmetro hematológico entre eles e em relação ao grupo controle-operado(*sham*).

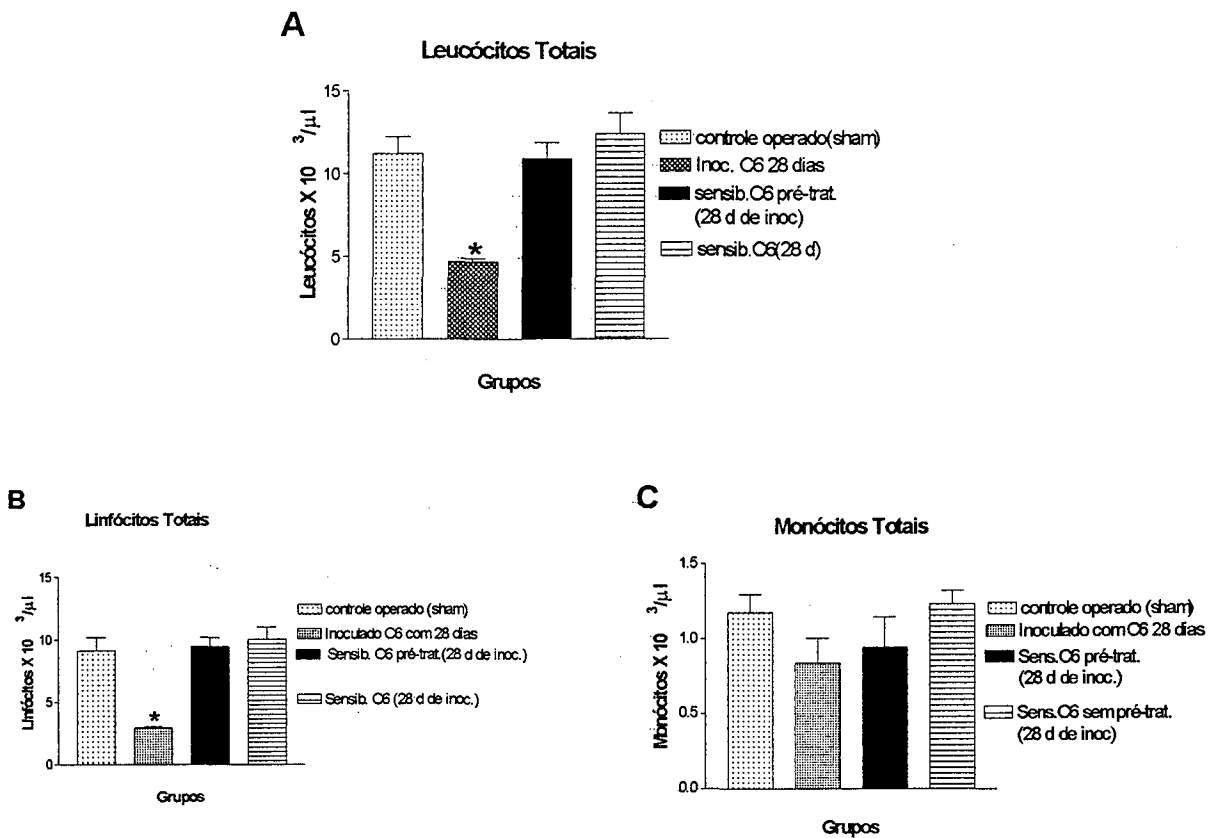


Figura 16: Parâmetros Sanguíneos da Série Branca em Animais Pré-sensibilizados com o Glioma C6 Analisamos os grupos de animais inoculados com C6 (14 ou 28 dias após a inoculação do glioma) e com C6 pré-tratado com clorato de sódio em meio contendo a droga (28 dias após a inoculação). Analisamos ainda os grupos de animais previamente sensibilizados com células C6 e posteriormente inoculados com o glioma (28 dias após a inoculação). Verificamos os leucócitos totais (A), linfócitos (B) e Monócitos (C). Análise estatística foi realizada pelo ANOVA seguido do teste de Dunnett. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos expressos em número de células por ml de sangue. As barras verticais correspondem ao erro-padrão da média. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, em relação ao grupo controle (sem tumor). Para estes testes foram usados 4 ou 5 animais.

Tabela 2: Parâmetros Sanguíneos da Série Vermelha

Grupos de animais	Hemácea ($\times 10^6/\text{ml}$)	Hematócrito (L%)	Hemoglobina (g/dl)
Animais Controle-operados(sham)-sem tumor	6,740 +/- 0,26	37,86 +/- 1,03	15,14 +/- 1,50
Animais inoculados com células C6 sem pré-tratamento (14 dias após-inoc.)	6,50 +/- 0,5	38,08 +/- 1,37	14,25 +/- 0,54
Animais inoculados com células C6 sem pré-tratamento (28 dias após inoc.)	7,95 +/- 0,63 *	43,50 +/- 2,10	16,45 +/- 0,70 *
Animais sensibilizados com células C6 sem pré-tratamento (28 dias após inoc.)	7,17 +/- 0,22	39,28 +/- 1,05	15,17 +/- 0,22
Animais sensibilizados com células C6 pré-tratadas com clorato de sódio (28 dias após inoc.)	6,770 +/- 0,16	39,50 +/- 2,46	14,50 +/- 0,78

Realizamos hemogramas nos diferentes tratamentos e analisamos as hemáceas, o hematócrito e a hemoglobina. Análise estatística foi realizada pelo ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls para avaliar a significância entre grupos. Os resultados são expressos como média e o desvio-padrão de cada grupo. Os valores encontrados estão dentro da faixa de normalidade para parâmetros sanguíneos de ratos, (ver tabelas anexas). O número de animais em cada grupo variou entre 4 e 6.

4.6. Teste da Arena de Exploração

Analizamos o efeito da progressão tumoral nos parâmetros comportamentais realizando o teste da Arena de exploração. Utilizamos como controle, o grupo de animais inoculados pela via intracerebral com veículo, pois o próprio trauma neurocirúrgico *per se* pode causar diminuição na sua capacidade exploratória. Porém, consideramos também os dados do grupo de animais não submetidos ao processo cirúrgico.

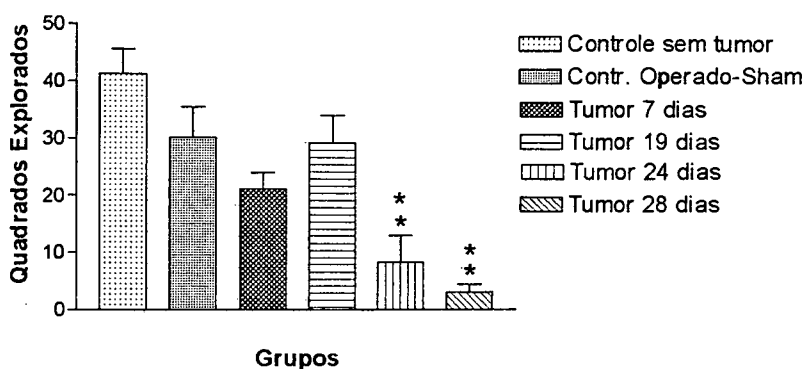
No grupo inoculado com células C6, observamos diminuição na frequência dos parâmetros comportamentais dos 24 aos 28 dias após a inoculação e até a morte dos animais.

Observamos diminuição significativa na exploração de quadrantes (horizontais) apenas aos 24 e 28 dias após a inoculação do glioma (8,250 \pm 10,60 e 3,0 \pm 3,90 quadrantes, respectivamente) em relação aos controle (animais submetidos à cirurgia) (30,10 \pm 13,0 quadrantes) (Fig. 17A). Do mesmo modo, houve diminuição da exploração vertical (*rearing*) aos 24 (3,50 \pm 3,40) e 28 dias (2,87 \pm 4,50) após a inoculação do tumor, comparado com o grupo controle (animais submetidos à cirurgia) (14,0 \pm 3,84) (Fig. 17 B). Foi verificada queda no número de bolos fecais aos 24 (1,0 \pm 1,40 bolos fecais) e 28 dias pós-inoculação (1,11 \pm 2,26 bolos fecais) em relação ao grupo de animais controle submetidos à cirurgia (5,40 \pm 2,20 bolos fecais) (Fig. 14C).

A Figura 18 demonstra que os animais inoculados com células C6 pré-tratadas com clorato de sódio apresenta redução significativa na (A) exploração de quadrantes em relação ao grupo controle submetido à cirurgia aos 28 (12,40 \pm 6,40 quadrantes) e 40 dias de pós-inoculação do glioma (14,830 \pm 6,96 quadrantes) e na (B) exploração vertical (*rearings*) nos mesmos períodos (28 dias, 6,40 \pm 4,77 e 40 dias, 5,5 \pm 2,66). O número de bolos fecais no grupo de animais inoculados com C6 e pré-tratada com clorato de sódio não diferiu em relação ao controle submetido à cirurgia (*sham*) (Fig. 18 C).

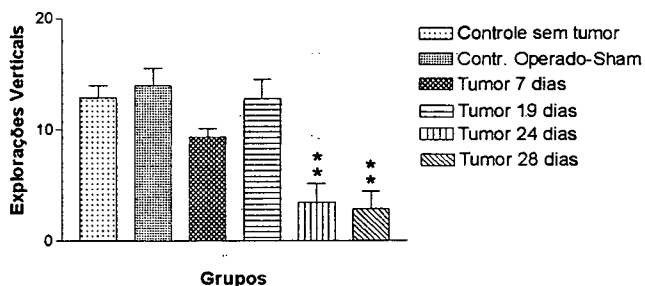
Visto que a partir dos 24 dias de pós-inoculação, tanto o grupo de animais inoculados com células C6 controle quanto o grupo inoculado com células C6 tratadas com clorato de sódio apresentavam redução significativa em suas frequências comportamentais, realizamos nova análise. Deste modo, a exploração de quadrados foi significativamente menor no grupo controle (sem tratamento com clorato de sódio) aos 24 e 28 dias de pós-inoculação (Fig. 19 A), enquanto que o comportamento de exploração vertical foi menor no mesmo grupo porém somente aos 24 dias de pós-inoculação (Fig. 19B). O número de bolos fecais em diferentes períodos não apresentou diferença

significativa entre os grupos experimentais (Fig. 19 C). Esses experimentos podem sugerir que, conforme o tumor cresce e ocupa uma área maior no parênquima, as frequências comportamentais observadas apresentam tendência à redução.



B

Exploração Locomotora Vertical (Rearings)



C

Bolos Fecais

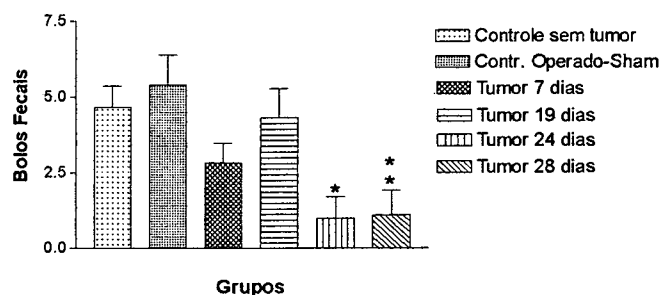


Figura 17: Frequências Comportamentais na Arena de Exploração em Animais Inoculados por via Intracerebral com C6. Os parâmetros comportamentais foram observados aos 7, 19, 24, e 28 dias após a inoculação intracerebral do glioma C6. Analisamos o comportamento de locomoção em quadrantes (A), explorações verticais - rearings (B) e bolos fecais emitidos (C). Foi procedido para a análise estatística o ANOVA seguido do teste de Dunnett. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos expressos número de vezes em que foi efetuado o comportamento, e as barras verticais correspondem ao erro-padrão da média. (*) $p < 0,05$, com relação ao grupo controle submetido à cirurgia (*sham*) porém sem as células C6. Para estes testes foi usado um número de animais que variou entre 5 e 8.

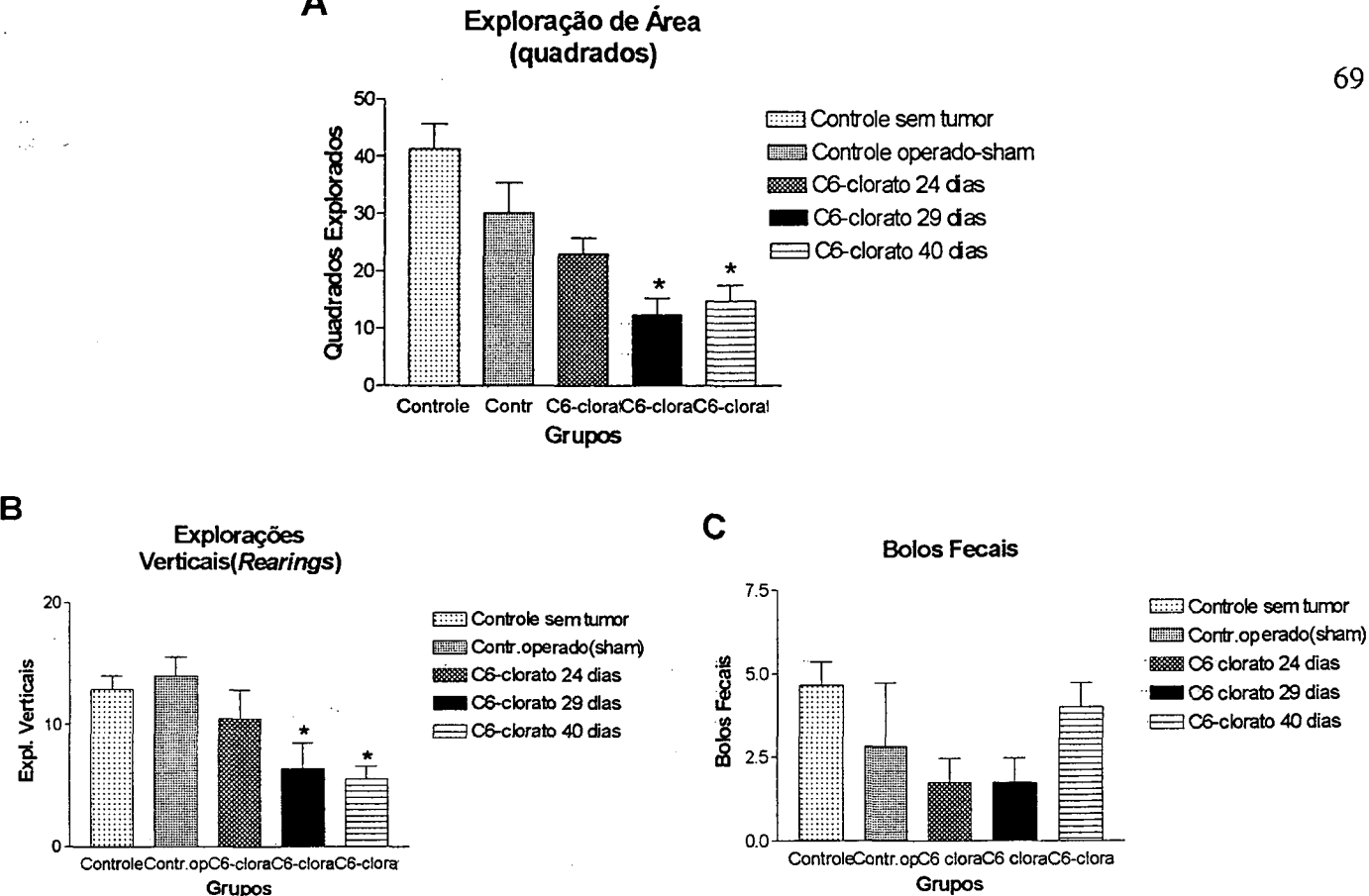


Figura 18) Comparação de Frequências Comportamentais na Arena de Exploração com Várias Idades de Inoculação em Animais Inoculados com C6 pré- tratada com Clorato por 48 horas. Os parâmetros comportamentais foram observados aos 24, 29 e 40 dias pós-inoculação intracerebral. Foi analisado o Comportamento de Locomoção em quadrantes (A), explorações verticais - *rearing*s (B) e bolos fecais emitidos (C). Foi procedido para a análise estatística o ANOVA seguido do teste de Dunnett . Cada coluna representa a média dos resultados obtidos. Os resultados são expressos em frequência do comportamento observado, e as barras verticais são o erro -padrão da média. Para cada resultado significativo foi indicado um asterisco (*) para $P < 0,05$, com relação ao grupo controle operado (sham) sem as células C6 . Para estes testes foi usado um número de animais que variou entre 5 e 8.

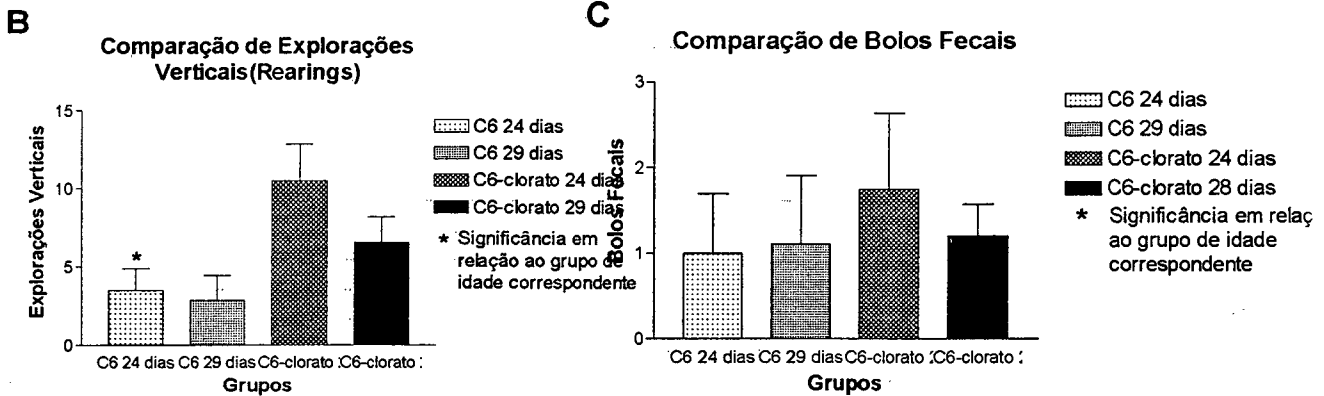
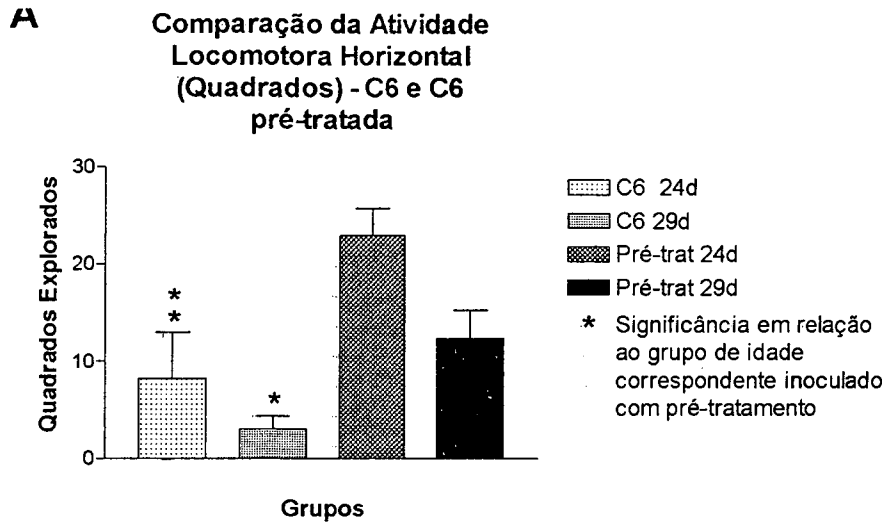


Figura 19: Frequências Comportamentais na Arena de Exploração em Animais Inoculados com células C6 pré-tratadas com clorato de sódio por 48 horas. Os parâmetros comportamentais foram observados aos 24, 28 e 40 dias após a inoculação intracerebral do glioma. Analisamos o comportamento de locomoção em quadrantes (A), explorações verticais - rearings (B) e bolos fecais emitidos (C). Foi procedido para análise estatística o ANOVA seguido do teste de Dunnett. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos expressos em frequência do comportamento observado, e as barras verticais correspondem ao erro padrão da média. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle submetido à cirurgia (*sham*) porém sem as células C6. Para estes testes foi usado um número de animais que variou entre 5 e 8.

Observamos, ainda a ocorrência de sintomas clínicos a partir de certo período de pós-inoculação do tumor. Os principais sintomas clínicos observados foram: ocorrência de paresia contralateral ao hemisfério de implantação do tumor (devido ao comprometimento de córtex motor e/ou sensitivo), bem como a presença de lacrimejamento periorbital, o que sugere um

aumento da pressão intracraniana típica de tumores avançados. Verificamos que tais sintomas se manifestaram geralmente em uma data próxima à morte dos animais, e que não estavam presentes em indivíduos que sobreviviam e/ou não desenvolviam o tumor. Notamos, também, que estes sintomas apresentaram diferentes frequências nos diversos grupos experimentais. (Tabela 3).

Tabela 3. Sintomatologia Clínica

Grupos Experimentais	Total de animais	lacrimejamento	Paresia contralateral
Animais inoculados com céls. C6 sem tratamento prévio (7 dias pós- inoculação)	15	0	0
Animais inoculados com céls. C6 sem tratamento prévio (14 dias pós- inoculação)	15	0	0
Animais inoculados com céls. C6 sem tratamento prévio (24 dias pós- inoculação)	15	1	1
Animais inoculados com céls. C6 sem tratamento prévio (28 dias pós- inoculação)	15	12	12
Animais inoculados com céls. C6 pré-tratadas com clorato de sódio e inocul. meio sem clorato- 28 dias pós- inoculação)	9	6	6
Animais inoculados com céls. C6 pré-tratadas com clorato de sódio e inocul. em meio clorato de sódio (28 dias pós- inoculação)	15	4	4
Animais sensibilizados com céls C6 controle (28 dias pós- inoculação)	9	2	3
Animais sensibilizados com céls. C6 pré-tratadas com clorato de sódio (28 dias pós- inoculação)	11	3	4

Nesta tabela foram observados dois aspectos da sintomatologia clínica, o lacrimejamento periórbita e a paresia (perda de capacidade motora) contralateral ao hemisfério cerebral em que foram inoculadas as células C6.

DISCUSSÃO

5.0 DISCUSSÃO

Experimentos *in vitro*:

5.1. Ensaio de Adesão:

Com a realização dos ensaios de adesão, notamos que tanto as proteínas de matriz extracelular (MEC) quanto os glicosaminoglicanos (GAGs) estudados foram capazes de alterar a adesão das células do glioma C6 aos poços de placas de ELISA.

As proteínas da MEC aumentaram a adesão celular de modo crescente, nas concentrações de 0,1 a 1,0 µg/well. Estes estudos de padronização demonstraram que 0,5 µg/well foi a menor concentração capaz de produzir o máximo de adesão, de modo similar para laminina, fibronectina e colágeno IV. A combinação de diferentes concentrações das proteínas da MEC não alterou significativamente a adesão de C6, sugerindo que a presença dessas três proteínas da MEC juntas em um substrato, suporta variações na sua concentração sem que se altere significativamente a adesão celular.

Sabendo que existem importantes evidências para o papel de proteoglicanos de superfície celular na modulação da adesão celular a proteínas da MEC (Faassen *et al.*, 1992), nos propusemos a analisar, então, a influência da adição de glicosaminoglicanos (GAGs) na adesão do glioma C6 sobre um substrato composto de laminina, fibronectina ou colágeno IV, isoladamente ou em combinação. Utilizamos a heparina (como um análogo do heparan-sulfato) e condroitin-sulfato, os GAGs mais comuns no sistema nervoso central (Dow e Wang 1998).

Nos experimentos de adição da heparina, obtivemos diferentes respostas conforme a proteína da MEC utilizada como substrato: inibição da adesão de C6 à laminina, aumento da mesma em colágeno IV e não alteração da adesão a fibronectina. Por outro lado, a presença de condroitin-sulfato em diferentes concentrações inibiu a adesão de C6 sobre as três proteínas da MEC testadas. Nestes ensaios, observamos comportamentos celulares diferenciados em relação à adesão celular quando sob a influência de heparina ou condroitin-sulfato, revelando uma possível especificidade na ação. Desse modo podemos sugerir que para cada GAG testado a amplitude e o tipo de resposta no que se refere à adesão celular sofra um tipo de influência

diferente, e ainda, que esta influência pode ser mediada pela proteína da MEC predominante nas áreas circundantes à célula, assim como pelos seus receptores membranares (como as integrinas) para moléculas da MEC.

Já é bem estabelecida que laminina e fibronectina, em sua estrutura conformacional, possuem sítios de ligação específicos para a heparina, e que esta ligação pode favorecer e modificar a interação de ambas com a célula (Alberts *et al*, 1997; Smith *et al* ; Ott *et al*, 1986). A superfície celular possui receptores para moléculas da MEC (integrinas) que podem induzir cascatas metabólicas diferenciadas conforme interação com a MEC (Yun-Bo -shi *et al*, 1998) . Sonderman e colaboradores (1999) sugerem que os complexos de adesão induzidos por laminina-1 e fibronectina parecem envolver diferentes associações moleculares. A molécula de adesão neural (NCAM) possui um sítio de interação com heparan-sulfato, essencial para adesão célula-célula (Kallapur,1992). Por outro lado, condroitin-sulfato apresenta efeito inibitório sobre a adesão de células nervosas em fibronectina (Carbonetto *et al*, 1983). Desse modo a ligação das proteínas da MEC com a superfície celular pode ser controlada pela interação com os GAGs. Embora o efeito observado seja evidenciando o contato célula-matriz, não podemos ignorar que o processo de adesão célula-célula também ocorre paralelamente e sinergicamente à adesão célula-substrato.

Dois outros protocolos foram realizados onde testamos o efeito da heparina pré-incubada com as proteínas da MEC ou pré-incubada com as células, onde observamos uma possível ação regulatória e específica da heparina sobre laminina, fibronectina e colágeno IV. O ensaio de pré-incubação da heparina com a MEC (Fig. 5) revelou que a adesão de C6 foi similar ao experimento anterior, com exceção da interação com o colágeno IV. Ou seja, heparina inibiu a adesão celular sobre laminina e colágeno IV, não apresentou efeito significativo sobre fibronectina e nem sobre a combinação das três moléculas. Este experimento pode sugerir que a heparina apresenta importante papel na organização da MEC, principalmente em laminina e fibronectina, a qual é essencial para a interação com a superfície celular. O modo de organização da MEC, pode estar influenciando a interação de laminina e fibronectina com as integrinas e assim alterando a adesão celular. O fato de colágeno IV não possuir sítio específico de interação com a heparina, pode explicar a diferença de resultado em relação ao experimento anterior em que a heparina estimulou a adesão de C6 ao colágeno IV quando incubada no momento do plaqueamento da célula.

Os complexos de adesão parecem não ter estruturas e funções moleculares idênticas devido à diversidade de funções celulares afetadas por esse mecanismo (Juliano and HasKill, 1993), sendo descritos diferentes complexos de adesão, incluindo tanto contatos focais quanto pontuais (Juliano and Haskill 1993). Assim, os efeitos da heparina e condroitin-sulfato alterando a adesão celular de C6, de forma particular para cada caso, pode indicar que variações na composição e organização da MEC e assim na interação da MEC com a superfície celular pode acarretar uma significativa modificação no comportamento celular.

Podemos supor, que em certos casos, a abundância dos GAGs no meio extracelular possa fazer com que se liguem, por interação de carga, à MEC, determinando uma significativa inibição na adesão celular ao substrato (como a observada nos experimentos de adição de condroitin-sulfato). É possível que possa existir, em sistemas onde ocorrem grandes concentrações de GAGs, um efeito de competição no qual as proteínas da MEC teriam seus sítios de ligação com integrinas ou outras proteínas de membrana comprometidos por interações com GAGs.

Com relação às células tumorais, a adesão, proliferação, migração e invasão são fundamentais para a instalação e progressão de um tumor (Alberts *et al*, 1997). Assim, a adesão é especialmente importante para que as células possam digerir a MEC adjacente, produzir novas proteínas da MEC, como também aderir através das proteínas de adesão célula-célula, às células circunvizinhas (Alberts *et al*, 1997). No processo de migração característico de tumores com altas taxas de proliferação, é necessário que ocorra primeiramente uma cascata bioquímica que modifique a adesão celular, para que a célula migratória se separe de seu tecido original e, por atividade ativa (proteolítica) ou passiva (levada pelo sangue ou pela linfa), alcance os outros tecidos-alvo (Haugland *et al*, 1997). Assim, uma célula com mais pontos focais de adesão estará mais presa ao seu substrato e o fenômeno da migração envolve um desprendimento gradativo do mesmo, de modo que a célula deve se privar de alguns de seus pontos de adesão para movimentar-se (Horwitz 1997). Desse modo, é lógico pensar nas diferentes influências das várias proteínas de matriz extracelular na regulação desses processos, tanto em situações fisiológicas, na homeostasia da forma e função tecidual, como em situações patológicas de dano tecidual (Streuli 1999), onde processos como migração, diapedese, apoptose e quimiotaxia se tornam muito mais evidentes. Como consequência, qualquer

molécula que atue no sentido de diminuir a adesão em uma célula cancerosa pode estimular a sua cascata de desprendimento e migração, induzindo a formação de metástases.

No início de um processo tumoral esta inibição da adesão poderia ser utilizada como uma ferramenta terapêutica importante. Isso porque, no início da formação do tumor, é necessário que as suas células formem um bloco coeso e centrado, de forma a atuarem de maneira sinérgica naquele foco para produzirem citocinas importantes para alterar a resposta imunológica celular local, e, mais tarde, sistêmica (Dix *et al.*, 1999). Deste modo, um pequeno número de células tumorais com uma distribuição não-focal em dado tecido pode não produzir a concentração de citocinas suficiente para a neutralização da competência imunológica local. Isto acarretaria uma sensibilização maior por parte do organismo hospedeiro, levando possivelmente à ativação da cascata de produção de anticorpos contra epítomos antigênicos das células tumorais, assim como o desencadeamento da ação das células citotóxicas do tipo “natural killer” (Dix *et al.*, 1997).

Os GAGs, tanto o condroitin-sulfato quanto a heparina, como demonstrado, podem alterar a capacidade de adesão de células C6. Desta forma, é possível que padrão de organização de GAGs à MEC contribua para a formação de um microambiente, decisivo não só para o fenômeno de adesão, mas também para a própria instalação e progressão tumoral. A alteração na concentração e organização local de GAGs pode vir a ser alvo de ferramentas terapêuticas futuras.

O padrão de secreção e síntese dos GAGs pode ser alterado por alguma drogas, como xilosídeos (Margolis, 1993) e o clorato de sódio (Baeuerle, 1986). Os xilosídeos têm como característica inibir o transporte de GAGs ao núcleo protéico de PGs no Complexo de Golgi, pois atuam como “primers” artificiais para o alongamento da cadeia de GAG. Como resultado estimula-se a secreção de GAGs livres na matriz não ligados a PGs (que ficam desfalcados dessas cadeias de açúcares) (Margolis, 1993). Já o sal clorato de sódio é um inibidor da enzima sulfato adenililtransferase (Greve *et al.*, 1988). Esta enzima é necessária para a formação do 3-fosfoadenililsulfato, importante na transferência do grupamento sulfato para GAGs. Como consequência do tratamento do clorato observa-se uma reduzida diminuição de sulfatos nos GAGs. Esta modificação de cargas, no entanto, pode modificar intensamente a interação de cadeias de proteoglicanos com outras proteínas da MEC, assim como com a superfície celular.

Pelo fato de o clorato de sódio ser capaz de modificar as cargas dos proteoglicanos sem alterar sua estrutura terciária ou sua localização espacial na MEC (Baeuerle, 1986), ele torna-se um modelo importante para o estudo das interações moleculares entre os GAGs's com o complexo matriz extracelular-superfície celular, de importância crítica para o estabelecimento tumoral. Alguns estudos pregressos do nosso laboratório (Mendes de Aguiar, 2000) demonstraram que o clorato de sódio é capaz de reduzir a adesão de células C6, assim como sua proliferação, ambos de forma dose-dependente. E ainda, que o pré-tratamento com clorato de sódio causa uma reorganização tanto de lamina quanto fibronectina. Técnicas de Western-Blott revelaram que existe um aumento da síntese de fibronectina por células C6 pré-tratadas com clorato de sódio, um efeito possivelmente compensatório. Foi realizado também um controle de toxicidade celular para se certificar de que as doses utilizadas não estivessem estimulando rotas bioquímicas de morte celular em vez de atuar preferencialmente sobre a síntese dos GAGs. Este teste, conhecido como Sytox-Green, ou teste de índice de apoptose, revelou que a concentração de 50 mM apresentou insignificante morte celular, quando este grupo tratado foi comparado com o controle (Mendes de Aguiar, 2000).

Os estudos *in vitro* sugerem que a interação de PGs com moléculas de MEC desempenham papel importante nos estágios iniciais do estabelecimento de glioma C6. Nos interessamos em testar o mesmo modelo *in vivo*, tentando uma aproximação com eventos clínicos conhecidos com estabelecimento de gliomas.

5.2. Experimentos *in vivo*:

No grupo inoculado com o tumor subcutâneo, clorato de sódio revelou ser eficiente em reduzir a massa tumoral após 30 dias de inoculação comparativamente ao controle. Nas inoculações intracerebrais, o pré-tratamento de C6 (48h) com o clorato de sódio e sua posterior inoculação em meio também contendo a droga, assim como o tratamento posterior à inoculação no sítio tumoral, mostraram ser eficientes em inibir o crescimento do glioma quando comparados a seus controles, revelado pelo aumento da sobrevivência dos animais. O pré-tratamento de C6 com a droga também proporcionou (pela análise histopatológica) uma redução na área ocupada pelo tumor após 10 dias de inoculação. Não houve, porém, diferença

significativa em relação ao controle sem pré-tratamento, quando as células C6 foram pré-tratadas e inoculadas em meio sem a droga, observado tanto pela sobrevivência do grupo de animais quanto pela análise histopatológica.

Sensibilizações prévias intraperitoneais com células pré-tratadas com clorato de sódio ou com células controle aumentaram a sobrevivência dos animais assim como, pela histopatologia, revelaram menor área tumoral, após a inoculação intracerebral de células C6.

Os hemogramas revelaram uma redução linfocitária após 24 e 28 dias de inoculação intracerebral, porém sem diferenças na leuco e linfometria entre os grupos sensibilizados, entre si e em relação ao controle. Os testes comportamentais revelaram redução em parâmetros exploratórios nos animais inoculados intracerebralmente com C6 sem qualquer pré-tratamento quando comparados com o grupo que recebeu C6 pré-tratada com clorato de sódio ou com o grupo controle-operado (*sham*).

5.2.1. Inoculações subcutâneas

Como estudo preliminar, padronizamos a técnica de implantação do glioma subcutâneo (a partir do trabalho de Johnson *et al*, 1993) para que tivéssemos uma noção do efeito do clorato de sódio sobre o desenvolvimento do tumor. Os resultados revelaram (Fig. 7) que a inoculação subcutânea de clorato de sódio em PBS inibiu a implantação do tumor em todos os animais analisados. O modelo subcutâneo indicou que os fenômenos de redução na proliferação e adesão celular, observados *in vitro*, após o tratamento com Clorato poderia também ocorrer *in vivo*.

Convém ressaltar, porém, que o experimento não representa uma situação patológica real, uma vez que gliomas não produzem metástases extraparenquimais, restringindo geralmente sua localização ao encéfalo (Bernstein & Woodard, 1995). Buscamos, pois, um modelo que representasse mais analiticamente a patologia como ela ocorre em casos documentados em pacientes humanos (Plate & Mennel, 1995). Optamos, assim, pela inoculação do glioma por método estereotático no parênquima encefálico.

5.2.1. Experimentos de Sobrevivência e Histopatologias - Inoculações Intracerebrais

O experimento de sobrevivência nos permitiu uma análise da eficácia do tratamento com clorato de sódio em reduzir o crescimento do glioma, devido à alta mortalidade dos animais não tratados, em intervalos de até quarenta dias, como pudemos observar em nossos experimentos (figura 10) Um tratamento eficaz contra o desenvolvimento do tumor implicaria em um número reduzido de mortes neste período crítico (redução de mortalidade), assim como em uma sobrevida maior daqueles animais que desenvolvessem o tumor (redução de morbidade e aumento da expectativa de vida). O experimento de sobrevivência constitui, um ensaio clínico real, no qual podem ser observados também os sintomas motores característicos da patologia (Hung , 2000), como a crescente astenia, a arreflexia e a paresia de membros (Fisher & Recht , 1989) (e posteriormente paralisia total). O aumento da pressão intracraniana promovido pelo aumento mecânico da massa tumoral, assim como pelo aumento exacerbado de fluxo sanguíneo local, pode ser observado externamente pelo aumento de secreção lacrimal periocular. Isto porque esta pressão hidrostática aumentada atinge os órgãos visuais (Miller *et al*, 1985), pressionando a glândula lacrimal.

Os resultados obtidos nestes experimentos demonstram que os diferentes os tratamentos envolvendo clorato de sódio foram eficazes em promover o aumento da sobrevivência dos grupos analisados (Figura 10). Realizamos pré-tratamento das células C6 em cultura com clorato de sódio (48 h.) utilizando (ou não, conforme o grupo experimental) a substância no veículo de inoculação. Realizamos, ainda, o tratamento com clorato de sódio posteriormente à implantação do tumor, sendo inoculado no local de aplicação das células, durante os cinco dias subsequentes. Verificamos, ainda que os animais sensibilizados intraperitonealmente, tanto com C6 controle quanto com C6 pré-tratada com clorato de sódio, apresentaram maior resistência ao desenvolvimento do tumor aplicado posteriormente no parênquima cerebral.

Inicialmente aplicamos o pré-tratamento com clorato de sódio por 48 horas a dois grupos experimentais, sendo que em um deles o meio de cultura com o qual as células foram inoculadas (o mesmo meio de cultivo) continha a droga e no outro grupo as células pré-tratadas foram inoculadas em meio de cultura sem clorato de sódio (Fig. 10 A e Tabela 1). A sobrevivência do grupo de animais que recebeu C6 pré-tratada e inoculada em meio com clorato de sódio foi significativamente maior do que a sobrevivência do grupo no qual as células pré-tratadas foram inoculadas em meio sem a droga. Este último grupo não apresentou

sobrevivência estatisticamente diferente daquela do grupo controle. O resultado pode sugerir que o pré-tratamento com 48 horas em meio contendo clorato (DMEM com clorato) *per se* não foi suficiente para modificar a sobrevivência dos animais, ou seja, neste protocolo as células continuaram viáveis, a despeito do tratamento empregado, para progressão tumoral. Este fato pode ser explicado por uma rápida metabolização dos proteoglicanos e pela ressulfatação rápida que ocorre quando retiramos o clorato de sódio do meio (Humphries & Silbert, 1988). Por outro lado, percebemos que a permanência da droga em contato com as células é capaz de reduzir a implantação do glioma e/ou a progressão da patologia. A substância permanecendo em contato com as células após a inoculação intracerebral, mantém a síntese de proteoglicanos com deficiência na sulfatação, dificultando a implantação do glioma.

A análise histopatológica, por sua vez, confirmou os resultados obtidos nos ensaios de sobrevivência. Assim como nos ensaios de sobrevivência, não encontramos diferença significativa no diâmetro da massa tumoral, após 10 dias de inoculação, entre o grupo controle e o grupo de animais inoculados com células C6 pré-tratadas e em meio sem clorato de sódio. Por outro lado, o grupo de animais inoculados com células C6 pré-tratadas e em meio contendo a droga, apresentou um diâmetro tumoral significativamente menor do que o do grupo de animais inoculados com células C6 controle e C6 pré-tratadas em meio sem clorato de sódio.

A secreção da matriz extracelular adequada é importante para a sobrevivência da célula tumoral, para a fixação e modelação do ambiente assim como para sua invasão. Timar e colaboradores (1995) demonstraram que o padrão de expressão de proteoglicanos é diferente nas células tumorais com diferentes potenciais metastáticos em fígado, sugerindo que células tumorais têm um padrão de expressão diferenciado de GAGs, o que talvez seja importante para seu estabelecimento. Engel e colaboradores (1999), sugerem que a expressão geneticamente aumentada do proteoglicano Decorina pelo glioma C6 está associada tanto a uma diminuição basal na expressão da citocina TGF- β quanto a uma diminuição da capacidade imunogênica das células da micróglia, fornecendo novamente a idéia de que modificações na expressão de proteoglicanos possam estar relacionadas a alterações proliferativas e metabólicas, assim como imunológicas.

Um dos passos importantes para a invasão tumoral é a digestão da matriz extracelular (MEC) adjacente ao tumor. Para tanto, as células lançam mão das metaloproteinases, enzimas que degradam a MEC. Desse modo, as metaloproteinases são bem mais expressas em gliomas

em progressão do que no parênquima adjacente (Kodera *et al*, 2000). Após esse processo, as células fabricam a sua própria MEC de instalação, com uma rapidez maior do que a do tecido adjacente, o que corrobora a idéia acima exposta de Timar e colaboradores (1995).

Deste modo, um desequilíbrio na produção e secreção dos elementos da MEC (como GAGs subsulfatados) pelas células do glioma poderia suscitar uma deficiência de fixação, proliferação e invasibilidade no parênquima cerebral.

Devemos considerar também que, quando inoculamos as células em meio contendo clorato de sódio, este também se difunde para o parênquima cerebral circunvizinho ao sítio de inoculação das células. Se o clorato de sódio reduz a proliferação e a adesão das células C6 (Mendes de Aguiar, 2000), é muito provável que estes mesmos efeitos sejam também observados nas células da glia do parênquima local. Isto faria com que a MEC sofresse alterações locais tanto da região de inoculação das células C6 quanto na das células normais adjacentes do organismo hospedeiro. Assim, a MEC temporariamente desorganizada, tanto das células tumorais quanto das hospedeiras, poderia contribuir para uma possível deficiência de instalação inicial da célula tumoral.

Devemos salientar, ainda que um dos efeitos indiretos do clorato de sódio nas células é o de inibir proliferação de células malignas (Alvarez-silva e Trentin, 1996; Mendes de Aguiar, 2000). Tais efeitos anti-proliferativos, desta forma, podem modificar a produção de citocinas, levando, em determinadas condições, a ativação local de células de competência imunológica. Alterações de atividade de células imunológicas são descritas pela literatura em casos de tratamento com clorato de sódio (Patel *et al*, 1993 ; Alston *et al*, 1997) Estudos feitos em cultura de células revelaram que células T linfoblásticas e endoteliais sofreram diferentes interações com vírus e bactérias conforme se apresentavam as suas cadeias de heparan-sulfato. O tratamento com clorato de sódio, foi capaz de inibir a absorção do material genético do vírus HIV nas células linfoblásticas (Patel *et al*, 1993), enquanto aumentou a aderência da bactéria *Staphilococcus Aureus* em células endoteliais (Alston, 1997). Estes fatos sugerem importante papel dos proteoglicanos no processo de reconhecimento e adesão célula-célula e célula-substrato, podendo mesmo apresentar conseqüências nos processos de reconhecimento e ativação utilizados por células imunológicas.

A redução da proliferação celular causada pelo clorato de sódio (Mendes de Aguiar, 2000) pode ser explicada pela demonstração de que certos fatores crescimento, para exercerem

seus efeitos mitogênicos precisam, além de uma ligação com o respectivo receptor celular, de um ancoramento em proteoglicanos (Yayom *et al*, 1991). É o caso do heparan-sulfato proteoglicano que pode se ligar ao fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e protegê-lo contra degradação (Ruoslahti e Yamaguchi, 1991). Além desse efeito, a ligação do bFGF ao seu receptor é dependente de uma ligação prévia do bFGF ao heparan sulfato (Yayom *et al*, 1991). É possível que o heparan-sulfato possua carga (dada pela sulfatação) e concentração ótimas para potencializar o efeito da citocina, pois tanto em baixas como em altas concentrações parece inibir a atividade e a fosforilação do receptor de bFGF (Fannon, 2000).

Perguntamo-nos, a seguir, se o clorato de sódio também seria capaz de reduzir o crescimento do glioma em tratamento posterior à implantação do tumor no parênquima cerebral hospedeiro. Para tanto procedemos à aplicação local da droga no sítio de inoculação do tumor (4ul a 100 mM, dose próxima à utilizada *in vitro*). O modelo de colocação de cânulas intracerebrais (a exemplo de Gavioli *et al*, 1999) veio nos permitir esta abordagem.

Como mostrado na Fig. 10 e Tabela 1, o tratamento com clorato de sódio, posteriormente à implantação intracerebral do glioma, inoculado via cânula, também foi eficiente em reduzir o crescimento tumoral. O grupo tratado posteriormente com veículo apresentou uma sobrevida significativamente menor do que aquele grupo tratado com clorato, embora este efeito tenha sido menor do que aquele observado com o pré-tratamento. No entanto, esses resultados não foram confirmados pela análise histopatológica, não havendo diferenças significativas no diâmetro médio tumoral entre o grupo de animais tratados com clorato de sódio e o tratado com veículo. Este resultado poderia ser explicado pela necessidade maior da integridade dos proteoglicanos para a implantação inicial do tumor no parênquima cerebral. Uma vez que o tumor já esteja bem estabelecido, a subsulfatação dos GAGs não é suficiente para promover a sua redução. Outra possibilidade a ser considerada é a de que a droga não tenha se difundido de modo eficiente para o interior do tumor.

A seguir indagamo-nos se o tratamento das células C6 com clorato de sódio, poderia torná-la mais vulnerável ao reconhecimento imunológico do animal, apresentando assim uma imunogenicidade maior. Foi realizado então, o protocolo de sensibilizações dos animais com células C6. Como demonstrado na Fig. 10B e Tabela 1, os animais pré-sensibilizados tanto com as células C6 controle (sem prévio tratamento) quanto com células C6 pré-tratadas com clorato de sódio, apresentaram menor incidência tumoral do que os animais não pré-sensibilizados.

Porém, não observamos diferenças significativas quando comparamos os grupos de animais sensibilizados com células C6 controle e com células C6 pré-tratadas. Os protocolos de sensibilização podem ser comparados a uma “vacinação” contra as células tumorais. As células do glioma inoculadas não tiveram a capacidade de desenvolver o tumor, apresentaram a propriedade de induzir sensibilização (e memória) imunológica por parte do organismo hospedeiro. O tratamento das células com clorato, segundo os métodos aplicados, não interferiu nessas propriedades no protocolo testado. Uma interessante colocação a esse respeito de Parsa e colaboradores (2000) sugere a partir de seus estudos que a inoculação de tumor C6 em ratos Wistar produz efeitos alogênicos na evocação da resposta imune, ao contrário do Glioma 9L usado em ratos da linhagem Fisher (com efeitos singênicos), o que coloca em questão o pareamento utilizado C6 para animais Wistar em estudos de resposta imune. De fato, o desenvolvimento de resistência ao tumor nos dois grupos sensibilizados na escala observada, se foi fruto de uma reação alogênica de C6, poderia ser reduzido se usássemos uma linhagem de células tumorais singênicas (ex: 9L para ratos Fisher). Poderíamos então, por utilizar um modelo de sensibilização imune com células mais específicas para a raça de animais utilizada possivelmente ter observado alguma diferença na sobrevivência ou na análise histopatológica entre os dois grupos sensibilizados (C6 e C6 pré-tratada).

As análises histopatológicas feitas 10 dias após a inoculação intracerebral das células C6 corroboram parcialmente os resultados obtidos nos experimentos de sobrevivência. Não encontramos diferenças significativas, quanto ao diâmetro médio dos gliomas entre os animais submetidos aos dois protocolos de sensibilização (com células C6 com ou sem tratamento prévio), embora estes tenham apresentado uma drástica redução do diâmetro tumoral quando comparados com o controle sem sensibilização. (fig. 12)

De modo geral, as análises histopatológicas confirmaram os resultados obtidos nos ensaios de sobrevivência. Analisamos os tamanhos absoluto e relativo do tumor, como também a presença e a área de necrose. Quanto a este último aspecto, não foram observados (salvo duas exceções em grupos diferentes) áreas necróticas relacionadas ao tumor. Assim, quanto ao aspecto da necrose observada aos 10 dias de inoculação, não houveram diferenças entre os grupos experimentais. De fato, o foco necrótico é mais característico em gliomas mais avançados, em fase altamente proliferativa e localizado no centro do tumor, parecendo ser

resultado de uma falta de vascularização em áreas de rápida expansão tumoral (e não da ação de células T) (Schneider *et al*, 1992).

5.4. Hemogramas

A literatura demonstra uma série de alterações imunológicas em pacientes com o desenvolvimento de glioma. Fatores secretados pelo glioma influenciam deste modo a resposta imunológica de seus hospedeiros, levando-os à imunossupressão (Dix *et al*, 1999). Os gliomas foram evidenciados sintetizando e secretando múltiplos fatores que são capazes de inibir respostas de células T, como o FGF- β 1, 2 e 3, TGF- β (Sasaki *et al*, 1995; Black *et al*, 1992; Constan *et al*, 1992), PGE2 (Castelli *et al*, 1989; Black *et al*, 1992), IL-10 (Hishii *et al*, 1995; Huettner *et al*, 1995, 1997) e gangliosídeos (Fredmann *et al*, 1999). Estes fatores atuam principalmente em linfócitos e monócitos (Dix *et al*, 1999).

Células T de pacientes com glioma, apresentam danos funcionais como diminuição na fosforilação de receptores tirosina quinase (Veillete *et al*, 1989; Abraham *et al*, 1991) e deficiência na mobilização intracelular de cálcio (Veillete *et al*, 1989; Abraham *et al*, 1991; Moford *et al*, 1997). Além disso apresentam síntese e resposta a IL-2 comprometida, o que ocasiona grande redução nas estimulações autócrina e parácrina (Elliot *et al*, 1997). Recentemente, Graf e colaboradores (2001) demonstraram que em gliomas induzidos a secretar citocinas, como IL-6, ocorre uma indução neutrofilo-dependente de resposta antitumoral com uma imunidade celular aumentada. Diante dessas afirmações, realizamos, hemogramas para verificar se em nosso modelo experimental, haveria também alterações leucocitárias, com especial ênfase, dadas as verificações clínicas da literatura (Dix *et al*, 1999), aos linfócitos e monócitos.

A análise das células imunológicas da série branca sugeriu uma tendência à imunodepressão conforme sugerido pela literatura (Dix *et al*, 1999), porém somente a contagem de células seja um dado que não permita conclusões mais elaboradas. O grupo de animais inoculados com células C6 sem pré-tratamento apresentou sobrevivência média de 31 dias, com queda significativa nos parâmetros na série branca leucometria global e linfometria aos 28 dias após a inoculação (Fig.16). Os linfócitos representam a grande maioria das células da série branca circulantes em um hemograma normal do rato (ver tabela anexa). Assim, no

rato Wistar, se observamos uma alteração na leucometria global devemos nos atentar principalmente para alterações na linhagem linfocitária. Podemos dizer que uma linfopenia (baixa de índice sanguíneo linfocitário) pode representar uma diminuição da atividade do sistema imunológico nestes animais. Na literatura encontramos que o desenvolvimento do glioma em fases avançadas é acompanhado de queda dos padrões sanguíneos da série linfocitária, normalmente acompanhada de uma depressão imune (Dix *et al*, 1999). Desse modo, podemos sugerir que a progressão do glioma aos 28 dias após inoculação intracerebral de células C6, poderia ter sido o responsável pela linfopenia e leucopenia observados.

Observamos deste modo uma queda de parâmetros leucocitários por volta da quarta semana pós-inoculação cerebral. Trabalhos como o de Peoc'h M e colaboradores (1999) sugerem que a fase angiogênica do tumor implantado de forma semelhante no rato tem início na terceira semana pós-inoculação. Podemos correlacionar esta queda de resistência imunológica observada com a fase angiogênica do tumor implantado no rato. Acreditamos que, com o início deste processo angiogênico, quando citocinas indutoras de neoformação vascular sejam secretadas pelas células tumorais, o tumor possa se tornar mais susceptível ao reconhecimento de células de competência imunológica, logo tenha que, concomitantemente a este processo angiogênico, lançar mão também de citocinas imunodepressoras.

Analizamos, ainda se ocorreria a presença de uma resposta de linfocitose após as sensibilizações com C6 e C6 pré-tratada com clorato de sódio, já que com a aplicação dos antígenos celulares (C6 intraperitoneal) poderia haver estimulação tanto de linfócitos T como, posteriormente, de linfócitos B, a fim de que se pudesse efetivar a produção de anticorpos. Os resultados de hemogramas da série branca (Fig. 14) demonstram não haver diferenças linfocitária, leucocitária ou monocitária significativas entre os grupos sensibilizados (antes da inoculação intracerebral de C6 e após 7 dias de sensibilização) e o grupo controle operado (sham). O grupo de animais inoculado intracerebralmente com células C6 (após 28 dias de inoculação) apresentou linfo e leucopenia em relação aos grupos sensibilizados (tanto com células C6 controle como com C6 pré-tratada) (Fig. 10). De acordo com este resultado não observamos linfocitose (ou leucocitose) nos grupos de animais sensibilizados (7 dias após a última sensibilização) em relação ao grupo controle operado. Porém, somente análise de contagem global de linfócitos e leucócitos não é suficiente para esclarecer se nos grupos sensibilizados ocorreu estímulo linfocitário no sentido de produção de anticorpos

(imunoglobulinas) contra antígenos presentes nas células C6 introduzidas intraperitonealmente, pois no experimento de sobrevivência houve uma clínica compatível com resistência imune adquirida o que não foi evidenciada na simples análise dos hemogramas.

A análise dos hemogramas dos grupos de animais sensibilizados revelou, no entanto, ser um parâmetro concorrente para confirmar a idéia de queda de resistência imunológica presente em estágios avançados de crescimento do gliomas, já que o grupo de animais simplesmente inoculados (sem sensibilização anterior) apresentou leuco e uma linfopenia, ao contrário dos grupos sensibilizados.

É importante ressaltar que não houve diferenças na contagem de células da série branca entre os grupos sensibilizados com C6 controle ou com C6 pré-tratada com clorato de sódio, como também entre análises feitas aos 7 dias posteriores à sensibilização e análises feitas aos 28 dias após a inoculação intracerebral em grupos sensibilizados. É possível que existam variações nas respostas imunológicas entre os grupos experimentais acima não detectadas numa simples contagem global de linfócitos, monócitos e leucócitos.

Analizamos, também parâmetros da série sanguínea vermelha para verificar desvios à esquerda (que em geral sugerem anemia) ou à direita (que sugerem lançamento de células imaturas na corrente sanguínea). Não detectamos, em nenhum dos grupos experimentais, anormalidades nos padrões sanguíneos da série.

5.4. Experimentos de Comportamento e Análise Sintomatológica

A análise comportamental dos efeitos da progressão do glioma foi realizada com o objetivo de complementar os resultados anteriores. Em nossos protocolos experimentais inoculamos os 5 µl de meio com células sempre na mesma coordenada estereotáxica, sendo que nos casos em que o tumor se irradiou partimos do pressuposto que este sempre o fez a partir do mesmo ponto inicial. Este ponto corresponde anatomicamente ao núcleo caudado-putâmen, uma área cerebral com funções primordialmente motoras (Angelo Machado, 1986). A progressão do tumor, tomando uma área cada vez maior e com um crescimento inicial de tendência concêntrica, poderia despertar sintomas de desordem motora nos membros e músculos contralaterais ao hemisfério inoculado.

Escolhemos o teste da Arena de Exploração por ser um teste essencialmente de avaliação motora (não envolvendo estudos de memória), realizada, *ad libitum* durante os cinco minutos de teste. A forma ou maneira de locomoção pode ser alterada pela progressão do glioma quando este passa a exercer influência sobre outras estruturas além do caudado putâmen, como o sistema límbico (motivacional), apresentando alterações em todo o comportamento motor que se refletem em todos os membros, e não exclusivamente naqueles contralaterais.

Observamos, inicialmente, uma paresia nos membros contralaterais, geralmente concomitante com uma diminuição da locomoção, mas com o avanço da patologia o movimento nos demais membros parecia se arrefecer, o que foi constatado pela diminuição drástica de movimentação no teste (Fig. 17). No entanto, não pudemos aferir se esta inibição de locomoção se deu primariamente por fatores primariamente emocionais ou primariamente motores.

Em uma análise mais detalhada, pudemos observar que houve uma redução de frequência comportamental (explorações verticais e horizontais) a partir de 24 dias pós-inoculação das células C6, acentuando-se após 28 dias de inoculação (Fig. 17).

A quantidade de bolos fecais emitidos também sofreu queda significativa nos mesmos períodos (Fig. 17). Como este parâmetro sugere o estado emocional do indivíduo durante a sessão experimental, podemos inferir que a progressão do glioma aos 24 e 28 dias pode também ter afetado os sistemas emocionais dos animais acometidos.

Observamos, porém, no grupo de animais pré-tratados com clorato de sódio uma inibição de frequências comportamentais aos 28 e 40 dias pós-inoculação intra-cerebral de células C6 (Fig.18). É possível que neste grupo de animais tenha ocorrido algum desenvolvimento tumoral, posteriormente reabsorvido pelo organismo, e que de alguma forma tenha comprometido o comportamento dos animais observados.

Realizando a análise comparativa entre estes dois grupos experimentais (controle e tratado, Fig. 19), verificamos que o grupo tratado com clorato de sódio apresentou valores de atividade exploratória maiores do que o grupo controle. A emissão de bolos fecais entre estes dois grupos não apresentou diferença significativa. Podemos atribuir estes dados ao fato de que o parâmetro de índice emocionalidade apresenta comumente altos desvios-padrão, por isso nem sempre reflete a tendência esperada e lógica. Pode ter ocorrido, ainda, alterações em sua

emocionalidade, sendo que mesmo um desenvolvimento inicial do tumor possa ter alterado de alguma forma a responsividade do sistema límbico, pois certas citocinas podem interferir no sistema emocional (Leonard and Miller, 1995).

A Tabela 3 demonstra que houve uma progressão ordenada de sintomas nos animais acometidos pelo tumor, sendo que a paresia contralateral foi a primeira a ser observada. Quase concomitante a ela, observou-se também uma hipersecreção de exudato periorbital lacrimal, que sugere neste quadro um aumento da pressão intra-orbitária, possivelmente causada pela compressão da massa tumoral no encéfalo como um todo. É provável que esta pressão aumentada intracranial tenha sido também responsável pela diminuição de frequências exploratórias e de emocionalidade supracitadas, por afetar o funcionamento de suas áreas cerebrais correspondentes. Observamos que após este estágio sintomático, quando submetidos ao teste da arena de exploração, os animais geralmente perdiam o controle motor de todos os seus membros.

CONCLUSÕES

6.0.CONCLUSÕES

6.1. Verificamos, pelos experimentos *in vitro* que as proteínas de matriz extracelular (lamina, fibronectina e colágeno IV) estimulam a adesão de células C6. O efeito é dose dependente (0,1 a 0,5 $\mu\text{g/poço}$) estabilizar-se a partir de 1,0 $\mu\text{g/poço}$. Em presença de uma matriz composta pela combinação das três proteínas estudadas, a variação de concentração em uma delas não altera a adesão do glioma C6, sugerindo a presença dessas três proteínas da MEC juntas em um substrato, suporta variações na sua concentração sem que se altere significativamente a adesão celular.

6.2. Heparina e condroitin-sulfato apresentam efeitos diferenciados sobre a adesão de C6 às moléculas da MEC. Heparina parece ter uma ação regulatória, principalmente sobre principalmente sobre a organização de laminina e fibronectina.

6.3. O tratamento com clorato de sódio se mostrou eficiente em inibir o crescimento do glioma C6 implantado subcutaneamente. A inoculação intracerebral de células C6 previamente tratadas com clorato de sódio também foi capaz de reduzir o crescimento do glioma C6, possivelmente por dificultar a implantação das células no tecido cerebral.

6.4. Pré-sensibilizações intraperitoniais com células C6 se mostraram eficientes em reduzir o crescimento do glioma quando inoculado intracerebralmente. Observamos um decréscimo progressivo do número de leucócitos totais e de linfócitos do grupo de animais com glioma intracerebral.

6.5. A análise da sintomatologia clínica e comportamental revelou queda progressiva das frequências de atividade exploratória e de sintomas clínicos como paresia contralateral, hipersecreção lacrimal e paralisia de membros, correlacionados ao crescimento intracerebral do glioma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abraham N, Miceli Mc, Parnes JR, Veillete A. Enhancement of T-cell responsiveness by the lymphocyte-specific tyrosine protein Kinase p56^{lek} *Nature* **350**:62-66, 1991.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D.: *Biologia Molecular da Célula*. 3ª edição. *Editora Artes Médicas Ltda*. Porto Alegre, RS, Brasil. 2064p, 1997

Alison Reith, Rolf Bjervig and Garry J. Rucklidge . Laminin: A potential Inhibitor of Rat Glioma Cell Invasion in vitro. *Anticancer Research* **14**:1071-1076.

Alston WK, Elliott DA, Epstein ME, Hatcher VB, Tang M, Lowy FD Extracellular matrix heparan sulfate modulates endothelial cell susceptibility to *Staphylococcus aureus*. *J.Cell Physiol* Oct;**173**:102-9, 1997.

Alvarez-Silva, M.; Trentin, A.G. (1996): Undersulfation of glycosaminoglycans reduces the proliferations of a leukemia cell line *in vitro*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **29**:1239-1242.

Archer J.- Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behav.***21**:205-235, 1973.

Angelo Machado: *Neuroanatomia Funcional*. *Edições Atheneu*, 1986.

Ausiello CM, Palma C, Malcci A, Spagnoli Gc, Amici C. Cytotoxicity and cytokine production in peripheral blood mononuclear cells of glioma patients. *Eur.J.Cancer*,**27**:646-650, 1991.

Baeuerle PA, Huttner WB Chlorate--a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells.

Biochem. Biofis.Res.Comm. Dec 15;141:870-7, 1986.

Bartus RT, Elliot P, Hayward N, Dean R, Mcwen EL, Fisher SK Permeability of the blood brain barrier by the bradykinin agonist, RMP-7: evidence for a sensitive, auto regulated, receptor-mediated system. *Neurooncol* 26:125-32, 1995.

Beck,K., Hunter,I. e Engel, J. Structure and function of Laminin: anatomy of a multidomain protein *FASEB J.* 4.,148-160, .1990.

Bellon G: Caulet, T ; Cam, Y ; Pluot, M ; Pytlinska , M , Bernard, M.H. : Immunohistochemical localization of macromolecules of the basement membrane and extracellular matrix of human gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol.(Berl)* 66:245-52 , 1985.

Benda, P. Someda, K.; Messer, J.; Sweet, E.: Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J. Neurosurg.* 34:310-323, 1971.

Benda, P.; Lightbody, J.; Sato, G.; Levine, L.; Sweet, W.: Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science.* 161: 370-371, 1968.

Bernstein, JJ & Woodard CA. Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels.*Neurosurgery* 36: 124-132 ,1995.

Boucaut,J.C., Johnson,K.E.,Darribere,T Delarue,M. Fibronectin-rich fibrillar extracellular matrix controls cell migration during amphibian gastrulation. *IntJ.Dev,Biol.*34, 139-147, 1990.

Breyer R, Hussein S, Radu DL, Putz KM, Gunia S, Hecker H, Samii M, Stan AC. Disruption of intracerebral progression of rat glioblastoma by in vivo treatment with anti-CD44 monoclonal antibody. *J Neurosurg* 92: 140-9, 2000.

Brooks WH, Netski MG, Normansell DE, Horwitz DA. Depressed cell-mediated immunity in patients with primary intracranial tumors. Characterization of a humoral immunosuppressive factor. *J. Exp. Med.* **13**: 1631-47, 1972.

Black KL, Chen K, Becker DP, Merrill JE. Inflammatory leukocytes associated with increased immunosuppression by glioblastoma. *J. Neuroimmunol.* **77**: 120-126, 1992.

Carbonetto S, Gruver MM and Turner DC. Nerve fiber growth in culture on fibronectin, collagen and glycosaminoglycan substrates. *J. Neurosci.* **3**: 2324-2335.

Castelli MG, Chiabrando C, Fanelli R, Martelli L, Butti G, Gactani P, Paoletti P. Prostaglandin and thromboxane synthesis by human intracranial tumors. *Cancer Research* **49**: 1505-8, 1989.

Clark and Colvin. Wound Repair in plasma fibronectin structure and function. *J. McDonagh*, ed. pp. 197-243, 1995.

Clark, E.A ; Brugge, J.S. : Integrins and signal transduction pathways: The road taken. *Science* **268**(5208): 233-9, 1995.

Constam DB, Phillip J, Malipiero UV, ten Dijke P, Schachner M, Fontana A. Differential expression of transforming growth factor β 1, β 2, and β 3 by glioblastoma cells, astrocytes and microglia. *J. Immunol.* **148**: 1404-1410, 1992.

Coyle, D.E.: Adaptation of C6 glioma cells to serum-free conditions leads to the expression of a mixed astrocyte-oligodendrocyte phenotype and increased production of neurite-promoting activity. *J. Neurosci. Res.* **41**: 374-385, 1995.

Cornet A, Bettelli E, Oukka M, Cambouris C, Adalid V, Kosmatopoulos K and Roland S. Liblau. Role of astrocytes in antigen presentation and naive T-cell activation. *J. Neuroimmunol.* **106**: 69-77, 2000.

De Clerck YA, Shimada H, Gonzalez-Gomes I, Rafael C. Tumoral invasion in the central nervous system. *J Neurooncol.* **18**: 111-21, 1994.

Denzer ,A.J., Brandenberger,R.; Geseman, M. ; Chiquet, M. ; Ruegg,M.^a Agrin Binds to the Nerve- Muscle Basal Lamina via Laminin. *The Journal of Cell Biol.*,**137**: 671-683, ,1997.

Dix AR, Brooks WH, Rozman TL, Moford LA Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors *Journal of Neuroimmunology* **100** :216-232 1999.

Dow KE e Wang W, Cell Biology of Astrocyte proteoglycans. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**: 567-581, 1998.

Elliot LH, Brooks WH, Rozman TL. Cytokinetic basis for the impaired activation of lymphocytes from patients with primary intracranial tumors.*J.Immunol.***132**: 1208-15, 1984.

Elliot LH, Brooks WH, Rozman TL.Role of interleukin-2 (IL-2) and IL-2 receptor expression in the proliferative deficit observed in mitogen-stimulated lymphocytes from patients with gliomas.*J .Nat. Cancer Inst.***78**: 919-22, 1987.

Engel S, Isenmamm S, Stander M, Rieger J, Bahr M, Weller M. Inhibition of experimental rat glioma growth by decorin gene is associated with decreased microglial infiltration. *J. Neuroimmunol.*; **99**:13-18, 1999.

Faassen,A. C. ; Schrager,J.A. ; Klein,D.T. ; Oegema,T.R.; Couchman,J.R. ; McCartly, J.B.: A cell surface chondroitin-sulfate proteoglycan , immunologically related to CD-44, is involved in type-I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion.*T.Cell Biol* **116**:521-31, 1992.

Fannon M, Forsten KE, Nugent MA Potentiation and inhibition of bFGF binding by heparin: a model for regulation of cellular response. *Biochemistry* Feb **15**;**39**:1434-45, 2000.

Fisher M, Retch LP Brain tumor presenting as na acute pure motor hemiparesis. *Stroke* **20**: 288-91, 1989.

Flugel A, Lauber MS, Grasbon-Frodl EM, Kreutzberg GW, Graeber MB Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells. *Brain Res* **843**: 95-104, 2000.

Fredmann P, Mansson J.-E, Delhden B, Bostrom K, von Holst H. Expression of the GM1-species [NeuN]-GM1, in a case pf human glioma. *Neurochem. Res.* **24**: 275-79, 1999.; Kwai *et al*, 1999.

Fukushima,T : Yamamoto,M. ;Ikeda,K. ; Tsuga,H. ; Kimura,H. ; Suma,G ; Tomonaga,M.): Treatment of malignant astrocytomas with recombinant mutant tumor necrosis factor-alpha (TNF-SAM2)*Anticancer res.* **18** :3965-70, 1998.

Fueyo J, Gomes-Mazano C, Yung WK, Kyristis AP Targeting in gene therapy for gliomas *Arch Neurol.* **56**: 445-8, 1999

Gavioli, E.C.; Canteras, N.S.; De Lima, T.C. Anxiogenic-like effect induced by substance P injected into the lateral septal nucleus. *Neuroreport*, **10**: 3399-3403, 1999.

Giòvarelli M, Santoni A, Jemma C, Musso T, Giufrida AM, Cavallo G, Landolfo S, Forni G. Obligatory role of Inf-gamma in induction of lymphokine-activated and lymphocyte killer activity, but not in boosting of natural cytotoxicity. *J. Immunol.* **141**: 2831-2836, 1998.

Gladson,C.L. ; Cherest,D.A. : Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin.Adhesion mechanism for transformed glial cells.*J.Clin.Invest.* **88**:1924-32, 1991.

Glioblastoma expression of vitronectin and the alfa v beta 3 integrin.Adhesion mechanism for transformed glial cells.*J Clin Invest* **88**:1924-1932.1991.

Goldbrunner, R.H.; Bernstein, J.J.; Tonn, J-C.: ECM-Mediated Glioma Cell Invasion. *Microscopy Research and Technique.* **43**:250-257, 1998

Goodman & Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics *Hardcover* 9th edition, 1996.

Graeff, F.G.-Ansiedade.In: Graeff, F.G.& Brandão, M.L.(eds)-*Neurobiologia das Doenças Mentais*, Lemos Editorial, São paulo, SP, 1996.

Graf MR, Prins RM, Merchant RE IL-6 secretion by a rat T9 glioma clone induces a neutrophil-dependent antitumor response with resultant cellular, antiglioma immunity . *J neuroimmunol* **166**: 121-9, 2001

Greve, H.; Cully, Z.; Blumberg, P.; Kresse, H.: Influence of chlorate on proteoglycan biosynthesis by cultured human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. **263**:12886-12892, 1988

Guenther, J.; Nick, H.; Monard, D. A glia-derived neurite-promoting factor with protease inhibitory activity. *EMBO J*. **4**.: 1985

Hasam,M. ; Najjam,S. ; Gordon,M.Y. ; Gibbs,R.V. ; Rider,C.C. : IL-12 is a heparin-binding cytokine *J.Immunol*.**162**: 21064-70, 1999

Haugland H.K.; Tysnes,B.B. ; Tysnes, O.B.(1997) : Adhesion and migration of human glioma cells are differently dependent on extracellular matrix molecules.*Anticancer Res*. **170**: 1035-42.

Hemler,M.E., Elices, M.J., Chan,B.M.C., Zetter ,B., Matsuura,N. e Takada ,Y.*Cell Differ.Develop*.**32**: 229-238, 1990.

Hervé Chneiweiss: Interdisciplinaridade no Estudo do Câncer. *Revista Ciência Hoje*, vol.18/n. 102, 1-13, 1994.

Hill JR , Kuryama N, Kuriam H, Israel MA Molecular Genetics of Brain Tumors *Arch Neurol* **56** : 439-41, 1998

Hishii M, Nitta T, Ishida H, Ebato M, Kurosu A, Yagita H, Sato K, Okomura K. Human glioma-derived interleukin-10 inhibits antitumor immune responses in vitro. *Neurosurgery* 37: 1160-1166, 1995

Hoogewerf AJ, Cisar LA, Evans DC, Bensadoun A Effect of chlorate on the sulfation of lipoprotein lipase and heparan sulfate proteoglycans. Sulfation of heparan sulfate proteoglycans affects lipoprotein lipase degradation. *J.Biol Chem* Sep 5; 266:16564-71, 1991.

Horwitz, AF. Integrins and Health. *Scientific American*, 46-53 May 1997.

Huettner C, Paulus W, Roggendorf W. Messenger RNA expression of the immunosuppressive cytokine IL-10 in human gliomas. *Am.J. Pathol.* 146:317-22, 1995.

Huettner C, Czub S, Kerkau S, Roggendorf W, Tonn JC. Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro. *Anticancer Res.* 17: 3217-24, 1997.

Humphries DE, Silbert JE Chlorate: a reversible inhibitor of proteoglycan sulfation. *Biochem biophys res commun* 154(1): 365-71, 1988.

Hung OR, Hare GM, Brien S. Head elevation reduces head rotation associated increased ICP in patients with intracranial tumors. *Can. J. Anaesth.* 47: 415-20, 2000.

Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell*, 69:11-25, 1992

Ilyin Se, Gayle D, Gonzalez-Gomez I, Miele ME, Plata-Salaman CR. Brain tumor development in rats is associated with changes in central nervous system cytokine and neuropeptide systems. *Brain Res Bull* 48:363-73, 1999.

James CD, Carlbram E, Dumanski JP, Hansen M, Mnordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK
Clonal genomic alterations in Glioma malignancy *Cancer Res* **48**: 5546-51, 1988

Johnson TR,; Trojan J; Rudin SD; Ilan ,Joseph ; Tykoscinski ML; Ilan, Judith Evoking an immune response to glioblastoma cells transfected with episome-based plasmid expressing antisense transcripts to insulin-like growth factor I. *Molecular Genetics of Central Nervous System* pp 387-400.

Jukkola A, Risteli J, Risteli Chlorate inhibits tyrosine sulfation of human type III procollagen without affecting its secretion or processing. *Biochem.Biofis.Res.Comm.*;170:264-9, 1990

Juliano,R.L. and Haskill,S. Signal transduction from the extracellular matrix.*J.Cell Biol.***120**,261-264, 1993.

Kallapur SG, Akeson RA The neural cell adhesion molecule (NCAM) heparin binding domain binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans *J Neurosci Res.* **33**:538-48, 1992

Khasigov PZ, .Khsanbaeva GSh , Rubachev PG, Nikolaev Aya e Grachev SV.Proteins of the Basement Membrane:A Review.*Biochemistry*, vol**61**, 825-36, 1996.

Kikuchi T, Joki T, Akasaki Y, Abe T,Ohno T Induction of antitumor immunity using intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) transfection in mouse glioma cells. *Cancer.Lett.***3**,.142:2201-6,1999.

Kleihues P, Soylenozoglu F, Schauble B, Scheithauer BW, Burger PC Histopatology, Classification and Grading of Gliomas *Glia* **15**: 211-21, 1995

Knupfer MM, Poppenborg H, Hotfilder M, Kuhnel K, Wolff JE, Domula M. CD44 expression and hyaluronic acid binding of malignant glioma cells. *Clin Exp Metastasis*, **17** : 71-6 1999.

Kodera T, Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Sato K, Kobayashi H. The expression and activation of matrix metalloproteinase-2 in rat brain after implantation of C6 rat glioma cells. *J Neurooncol* 46:105-14, 2000.

Kohn, E.C.; Alessandro, R.; Spoonster, J.; Wersto, R.P.; Liotta, L.A. Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:1307-11, 1995.

Kowalski J, Stachura Z, Bierzyska-Macyszyn G, Madej A, Belowski D, Herman ZS. The effect of astrocytoma cells on secretion of cytokines by autologous lymphocytes *Neurol. Neurochir.* 33:3551-6, 1999.

Kulla A, Liigant A, Piirsoo A, Rippin G Tenascin expression patterns and cells of monocyte lineage: relationships in human gliomas. *TModPathol*.13:156-6. 2000

Lander, A.D.; Tomaselli, K.J.; Calof, A.L.; Reichardt, L.F. : Studies on extracellular matrix components that promote neurite outgrowth. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 48:611-623, 1983.

Laurie,G.W., Bing,J.T.Feldmann,J.R.. Localization of binding sites for laminin, heparan-sulfate proteoglycan and fibronectin on basement membrane (type IV) collagen. *J.Mol. Biol.*189,205-216, 1986.

Lengauer, C.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.: Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 396: 643-9. , 1988

Leonard Be and Miller K . Stress, the immune system and psychiatry. *Ed John Wiley & sons*, 1995.

Mahaley MS, Gentry RE, Bigmer DD Immunobiology of primary intracranial tumors.*J Neurosurg* 47: 35-43 , 1977

Manning, Aubrey: Introdução ao Comportamento Animal. *Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.* 1979.

Margolis RK, Goosen B, Tekotte H, Hilgenberg L and Margolis RU. Effects of β -xilosides on proteoglycan biosynthesis and morphology of PC12 pheochromocytoma cells and primary cultures of rat cerebellum. *Journal of Neural Science* **99**:237-246, 1991.

Margolis, R.K. e Margolis, R.U.: Nervous tissue proteoglycans. *Experientia* **49(5)**:429-46, 1993.

Martin, g.r. e Timpl, R Laminin and other basement membrane components. *Annu. Rev. Cell Biol.* **3**:57-85, 1987

McCauley PT, Robinson M, Daniel FB, Olson GR . The effects of subchronic chlorate exposure in Sprague-Dawley rats. *Drug Chem Toxicol* **18**:185-99, 1995.

Mendes de Aguiar; C.B. ; Alvarez-Silva, M. ; Trentin, A.G Undersulfation of Glycosaminoglicans alters Laminin and Fibronectin Organization in Rat Glioma Cell Line. *Anais do SIMEC* **98**: 93, 1998

Mendes de Aguiar; C.B.; Alvarez-Silva, M.; Trentin, A.G Sulfatação de Glicosaminoglicanos controla proliferação e organização da matriz extracelular no glioma C6. *Anais da FESBE* **99**: 225, 1999

Miller DF, Bay JN, Lederman RJ, Purvis JD, Rogers LR, Tomsak RL Ocular and orbital toxicity following intracarotid injection of BCNU (carmustine) and cisplatinum for malignant gliomas. *Ophthalmology* **92**: 402-6, 1995.

Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Programas de controle do Câncer no Brasil, 4ª edição 1997.

Montgomery, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J.Comp.Physiol.Psychol.*, **48**:254-260, 1955.

Mossmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**: 55-63, 1983.

Paulus, W. ; Baur, I. ; Bentler, A.S. ; Reeves, S.A Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta I integrins. *Lab.Invest.* **75**: 819-26., 1996

Plate, KH & Mennel HD. Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors. *Exp.Toxic.Pathol.* **47**:89-94, 1995.

Okamoto Y, Yamashita J, Hasegawa M, Fujisawa II, Yamashita T, Hashimoto T, Nonomura A, Matsumoto Y, Kida S Cervical lymph nodes play the role of regional lymph nodes in brain tumor in rats. *Neuropathol, Appl Neurobiol* **25**: 113-22, 1999.

Ott, U. , Odermatt E, Engel J, Furthmayr H and Timpl R Protease resistance and conformation of laminin *Eur. Jour. Biochemistry* **123**: 63-72, 1986

Parsa AT, Chakrabati I, Hurley PT, Chi JH, Hall JS, Kaiser MG, Bruce JN Limitations of the C6/Wistar rat intracerebral glioma model: implications for evaluating immunotherapy *Neurosurgery* **vol.47**: 993-1006, 2000.

Patel M, Yanagishita M, Roderiquez G, Bou-Habib DC, Oravec T, Hascall VC, Norcross MA Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *Aids Res.Human Retroviruses*, **9**:167-74, 1993

Paxinos G e Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Spiral Bound*, 1998.

Peoc'h M, Le Duc G, Trayaud A, Farlon R, Le Bas JF, Pasquier B, Remy C. Quantification and distribution of neovascularization following microinjection of C6 glioma cells in rat brain. *Anticancer research* **19**:3025-30, 1999.

Perrin G, Schnuriger V, Quiquerez AL, Saas P, Pannetier C, de Tribolet N, Tiercy JM, Aubry JP, Dietrich PY, Walker PR. Astrocytoma infiltrating lymphocytes include major T cell clonal expansions confined to the CD8 subset. *Int.Immunol.* **11**:81337-50, 1999.

Phamantu NT, Fagnen G, Godard F, Bocquet J, Bonnamy PJ Sodium chlorate induces undersulfation of cellular proteoglycans and increases in FSH-stimulated estradiol production in immature rat Sertoli cells. *J Androlog.* **20(2)**:241-50, 1999.

Pietish T, Valter MM, Wolf HK, von Deimling A, Huang HJ, Cavenee WK, Wiestler OD. Expression and distribution of vascular endothelial growth factor protein in human brain tumors. *Acta Neuropathol(Berl)* **93(2)**: 109-17, 1997

Plautz GE, Barnett GH, Miller DW, Cohen BH, Prayson RA, Krauss JC, Luciano M, Kangisser DB, Shu S. Systemic T cell adoptive immunotherapy of malignant gliomas. *J.Neurosurg.* **89**:142-51, 1998

Pu P, Liu A, Cui J, Zhang Y. Inhibitory effect of antisense epidermal growth factor receptor on the proliferation of rat C6 glioma cells in vivo and in vitro. *J Neurosurg* **92(1)**:132-9, 2000.

Pucillo, C.E.; Colombatti, A.; Vitale, M.; Salzano, S.; Rossi, G.; Formisano, S.: Interactions of promonocytic U937 cells with proteins of the extracellular matrix. *Immunology.* **80**:248-52., 1993

Robinson, G.B. e Walton, H.A. Glomerular Membrane as a Compressive Ultrafilter **38**: 36-48. *Microvasc.Res.* **38**, 36-48 1989.

Rouvier E, Luciani MF, Goldstein P. Fas involment in Ca (2+) independent T cell mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 177-1 : 195-200, 1993

Ruddon, R.W.: Cancer biology. *Oxford University Press*. Third Edition. 520p. 1995

Ruoslahti, E e Yamaguchi,Y: Proteoglycans as modulators of growth factors activities.*Cell* 64:867-9. , 1991

Rutka,J.T. ; Ackerley,C. ; Hubbard,S.C. ; Tilup,A. ; Dirks,P.B. ; Jung, S.; Ivanchak,S.; Kurimoto , M. ; Tsugu A. ; Becker,L.E.: Characterization of glial filament cytoesqueletal interaction in human astrocytomas: an immuno-ultrastructural analysis.*Eur.J.Cell Biol.*76: 279-87, 1998.

Saris,S : Multidisciplinary approach to malignant gliomas.*Med Health R.I.* 79: 210-213, 1993.

Sazaki A, Nagamura H, Satoh E, Nagasaka M, Isoe S, Nakano S, Nukui H Secretion of transforming growth factor- beta 1 and -beta 2 by malignant glioma cells. *Neurol Med. Chir.*35: 423-30, 1995

Schiffer,D ; Cavalla,P.; Dutto,A ; Borsotti,L:Cell Proliferation and Invasion in Malignant Gliomas. *Anticancer Research*17:61-70, .1997.

Schneider J, Hofmn FM, Apuzzo ML, Hilton DR. Cytokines and Immunoregulatory molecules in malignant glial neoplasms. *J Neurosurg* 77 : 2 265-73, 1992

Smith S, Ramirez VD. Celular localization of dopamine-releasing protein (DARP) in rat C6 glioma and primary mesencephalic cell cultures.*Brain Res.* 843 : 95-104, 1999.

Smith DE and Furcht LT Localization of two unique heparin binding domains of human plasma fibronectin with monoclonal antibodies.*j Biol. Chem.*257: 6518—6523, 1982

Sondermann, H.Dogic,D.; Pesh,M.; Aumailley,M.. Targeting of Cytoesqueletal Linker Proteins to Focal Adhesion Complexes is Reduced in Fibroblasts Adhering to Laminin-1 when Compared to Fibronectin. *Cell Adhesion and Communication*, vol 7, 43-56, 1999.

Sottocornola E, Colombo I, Vergani V, Taraboletti G, Berra B. Increased tumorigenicity and invasiveness of C6 rat glioma cells transfected with the human alpha-2,8 sialyltransferase cDNA. *Invasion Metastasis*,18:142-54, 1999.

Steffen C, Wetzel E . Chlorate poisoning: mechanism of toxicity. *Toxicology* 12; 84(1-3):217-31,1993

Streuli, Charles Extracellular Matrix remodelling and cellular diferentiatuion *Current Opinion in Cell Bilogy* 11: 634-640, 1999.

Takanori Inamura,, Tomojiro Nomura, , Raymond T.Bartus, and Keith L. Black Intracarotid infusion of RMP-7, a bradykinin analog:a method for selective drug delivery to brain tumors.*J.Neurosurg*.81:752-58, 1994

Tamaki,M ; Mcdonald,W. ; Amberger,V.R.; Moore, F. ; Del Maestro,R.F Implantation of C6 astrocytoma spheroid into collagen type I gels: invasive, proliferative and enzymatic characterizations.*J.Neurosrg*.87: 602-9, 1997

Timar,J. ; Diczahti,C. ; Bartha,I. ; Pogany,G. ; Paku,S. ; Raso,E. ; Tovari,T. ; Ladanyi,A. ; Lajais,K. ; Kopper,L. *et al.*: Modulation of heparan-sulfate/chondroitin-sulfate ratio by glycosaminoglycans biosynthesis inhibitors affects liver metastatic potential of tumor cells.*Int.J.Cancer*.62:755-61, 1995.

Timpl, R , Paulsson M, Dziadek M, Fujudora S. Basement Membranes. *Meth Enzimol* 145: 363-91, 1987

Toda M, Miura M, Asou H, Sugiyama I, Kawase T, Uyemura K. Suppression of glial tumor growth by expression of glial fibrillary acidic protein. *Neurochem Res* 24:339-43, 1999.

Trentin, A.G.. Diferenciação e proliferação astrocitária: o hormônio da tireóide induz a síntese e secreção de fatores de crescimento. *Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro*. 60p. , 1997.

Trojan,J. ; Johnson,T.R. ; Rudin,S.D. ; Ilan,Judith. ; Tykocinski,M.L. ; Ilan,Joseph Treatment and prevention of rat glioblastoma by Immunogenic C6 cells Expressing Antisense Insuline-like growth factor I RNA.*Science*,vol.259:94-96, 1993.

Trueb,B., Groboli, B.Spiess,M., Odermatt,B.F. e Winterhalter, K.H Basement Mmbrane Collagen type IV is a heteropolimer *J.Biol.Chem*:257: 5239-45 ,1982 .

Tseng,S.-H. ; Hwang,L.-H. ; Lin,S.-M. : Induction of Antitumor Immunity by Intracerebrally Implanted Rat C6 Glioma Cells Genetic Engineered to Secrete Citokines. *Journal of Immunotherapy* 20:334-342, 1997.

Veillette A, Bolen JB, Bookman MA. Alterations in tyrosine protein phosphorylation induced by antibody-mediated cross-linking of the CD4 receptor of T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 9 : 4441-6, 1989

Venstrom, K.A. & Reichardt, L.F. : Extracellular matrix 2: role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB J*. 7: 996-1003, 1993.

Watanabe T, Katayama Y, Kimura S, Yoshino A. Control of proliferation and survival of C6 glioma cells with modification of the nerve growth factor autocrine system.*J Neurooncol* 41 :121-8. 1999

Woodburn,G,Wooddruf,G.N.:Neuroprotective actions of excitatory aminoacid receptor antagonists.*Adv.Pharmacol.***30**:31-33, .,1994.

Wu,C.; Keivens,V.M. ; Otoole,T.E.; McDonald,J.A. ; Ginsberg,M.H.Integrin Activation and Cytoeskeletal Interaction are Essential for the assembly of a Fibronectin Matrix *Cell*, **83**: 715-724, 1995.

Yayom,A.; Klagsbrin,M. ; Esko,J.D. ; Leder,P. ; Ornitz,D,M):Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor.*Cell*,**64**:841-8, 1991

Young HF et Kaplan AM Cellular immune deficiency in patients with glioblastoma.*Surg. Forum* **27**: 476-8, 1976.

Yun-bo shi, Qing LI, Sashko Damjanovski, Tosikazu Amano and Atsuko Iushizuya-oka Regulation of apoptosis during development: input from the extracellular matrix *International Journal of molecular medicine* **2**: 273-282, 1998.

Zhang ,H. ; Kelly,G. ; Zerillo,C. ; Tawaski,D.M. ; Hockfield,S. : Expression of a cleaved brain-specific extracellular matrix protein mediates glioma cell invasion *in vivo*.*J.Neurosci.* Apr.1;**18**:2370-6, 1998.

Zsuza Fabry, Craine CS,Hart MN: Nervous tissue as na immune compartment: the dialect of the imune response in the CNS. *Immunology today* **15**:218-224.1994.

TABELA ANEXA

8.0. TABELA ANEXA

8.1. Valores Hematológicos Normais do Rato Macho Adulto (2-4 meses)

Hematócrito	Hemoglobina	Hemáceas	Leucócitos	Linfócitos	Monócitos
44,23 ± 1,89	14,06 ± 1,72	7,26 ± 1,01	7,02 ± 2,82	5,68 ± 1,92	0,39 ± 0,37

Dados obtidos a partir de média de padrões de várias linhagens de rato descritas em: Lee GR, Bithel TC, Foerster J, Athens JW, Lukens J, . Hematologia Clínica Editora Manole Ltda, 1ª edição, volume II, São Paulo, 1998.